

CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN REDOX DEL FACTOR DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS HUMANO (hAIF)



Alejandro Usón Ferrando

Máster en Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza

2012



**Universidad
Zaragoza**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

PROYECTO MÁSTER

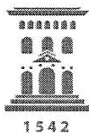
**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN REDOX
DEL FACTOR DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS
HUMANO (hAIF)**

Memoria presentada por ALEJANDRO USÓN FERRANDO

bajo la dirección de la Dra. PATRICIA FERREIRA NEILA

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

ZARAGOZA, SEPTIEMBRE DE 2012



**Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza**

Dr Patricia Ferreira
Facultad de Ciencias
50009-Zaragoza
Tel (34)-976762476
email: ferreira@unizar.es

La Dra. Patricia Ferreira Neila, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que el Proyecto Máster “**Caracterización de la función redox del factor de inducción de apoptosis humano (hAIF)**” ha sido realizado por el licenciado Alejandro Usón bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para ser defendido y optar al Título de Máster en Investigación en Biología Molecular y Celular por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 3 de Septiembre de 2012

Fdo: Dra. Patricia Ferreira Neila

<u>Resumen</u>	1
<u>1. Introducción</u>	
1.1. Flavoproteínas, FAD y NADH	5
1.2. Apoptosis	6
1.3. Factor de inducción de apoptosis (AIF)	7
1.3.1. Descubrimiento, secuencias e isoformas	7
1.3.2. Función óxido-reductasa	9
1.3.3. Estructura molecular de AIF	11
<u>2. Objetivos</u>	17
<u>3. Materiales y métodos</u>	
3.1 Material biológico	22
3.2 Expresión de hAIF _{Δ1-102} , de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, y de las variantes hAIF _{Δ1-54} y hAIF _{Δ1-340}	21
3.2.1 Transformación	21
3.2.2 Pruebas de expresión	21
3.2.3 Cultivo a media escala	22
3.3 Purificación de hAIF _{Δ1-102} , de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, y hAIF _{Δ1-54} y hAIF _{Δ1-340}	22
3.4 Caracterización espectroscópica de hAIF _{Δ1-102} y mutantes	23
3.4.1 Espectros UV-visible de hAIF _{Δ1-102} y mutantes, y determinación de sus coeficientes de extinción	23
3.4.2 Espectroscopía diferencial	23
3.5 Caracterización de la actividad óxido-reductasa de hAIF _{Δ1-102} y de sus mutantes	24
3.5.1 Caracterización cinética en estado estacionario	24
3.5.2 Caracterización cinética en estado pre-estacionario	24

4. Resultados

4.1	Expresión y purificación de hAIF _{Δ1-102} , de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, y de hAIF _{Δ1-54} y hAIF _{Δ1-340}	29
4.1.1	Expresión y purificación de hAIF _{Δ1-102} y de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A	29
4.1.2	Expresión y purificación de hAIF _{Δ1-54} y hAIF _{Δ1-340}	30
4.2	Caracterización espectroscópica de hAIF _{Δ1-102} y mutantes	33
4.2.1	Espectros UV-visible de hAIF _{Δ1-102} y mutantes, y determinación de sus coeficientes de extinción	33
4.2.2	Espectroscopía diferencial	34
4.3	Caracterización de la actividad óxido-reductasa de hAIF _{Δ1-102} y de sus mutantes	34
4.3.1	Caracterización cinética en estado estacionario	34
4.3.2	Caracterización cinética en estado pre-estacionario	35
4.3.2.1	Reducción de hAIF _{Δ1-102} con NADH en cantidades equimolares	35
4.3.2.2	Reacción de transferencia de hidruro desde el NADH a los mutantes de hAIF _{Δ1-102}	36

5. Discusión 43**6. Conclusiones** 49**7. Bibliografía** 53

Resumen

Resumen

El factor inductor de apoptosis (AIF) es una flavoproteína principalmente conocida por su actividad pro-apoptótica, aunque también presenta actividad NAD(P)H óxido-reductasa gracias a su cofactor FAD. Se piensa que ambas funciones podrían estar relacionadas.

En este proyecto principalmente se ha caracterizado la función óxido-reductasa de la forma humana apoptótica de AIF (hAIF $_{\Delta 1-102}$) mediante el estudio de los residuos W483, F310, P173 y H454, pertenecientes al centro activo, y E413, R422 y R430, vinculados a la dimerización. Para ello se ha reemplazado dichos residuos y se ha estudiado el proceso de transferencia de hidruro de las proteínas mutantes.

También se ha estudiado la reactividad de hAIF $_{\Delta 1-102}$ reducida con sustratos de tipo quinona, siendo ésta muy baja, así como la afinidad de unión entre hAIF $_{\Delta 1-102}$ oxidada y NAD⁺, la cual no se ha detectado. También se ha logrado la expresión y optimización de las condiciones de cultivo de la forma mitocondrial hAIF $_{\Delta 1-54}$ y la forma trunca hAIF $_{\Delta 1-340}$.

Con respecto al estudio de los mutantes, los residuos P173 y H454 son claves en la unión del FAD y en la estabilización del complejo de transferencia de carga, mientras que el residuo F310, además de estar implicado en la estabilización del cofactor, también participa en alguna de las etapas del mecanismo de transferencia de hidruro.

Los residuos E413, R422A y R430, que participan en la dimerización, también alteran la velocidad de transferencia de hidruro y la unión del cofactor, por lo que la dimerización también podría regular la actividad óxido-reductasa de la proteína.

En conclusión, tanto los residuos del centro activo como los que intervienen en la dimerización son esenciales para la actividad óxido-reductasa, ya que su sustitución altera el proceso de transferencia de hidruro y la unión entre la proteína y el coenzima.

1. Introducción

1.1. Flavoproteínas, FAD y NADH:

Las flavoproteínas están implicadas en un gran número de procesos biológicos, como el desarrollo embrionario (Murty *et al.*, 1982; White *et al.*, 1988), la muerte celular programada (Susin *et al.*, 1999) y procesos dependientes de luz como la fotosíntesis (Zanetti *et al.*, 1991) y la replicación del DNA (Jorns *et al.*, 1987). Gran parte de éstas actúan como biocatalizadores gracias a su cofactor, FAD o FMN, mostrando una gran selectividad, control y eficiencia en las reacciones que catalizan.

La parte reactiva de los cofactores flavínicos es el anillo de isoaloxacina, que puede presentar tres estados de óxido-reducción: oxidado (quinona), reducido por un electrón (semiquinona) y reducido por dos electrones (hidroquinona). El proceso de óxido-reducción de la flavina es reversible, pudiendo transferir un solo electrón en dos etapas de transferencia a través del intermediario semiquinona, o dos electrones en una sola etapa de transferencia (Figura 1).

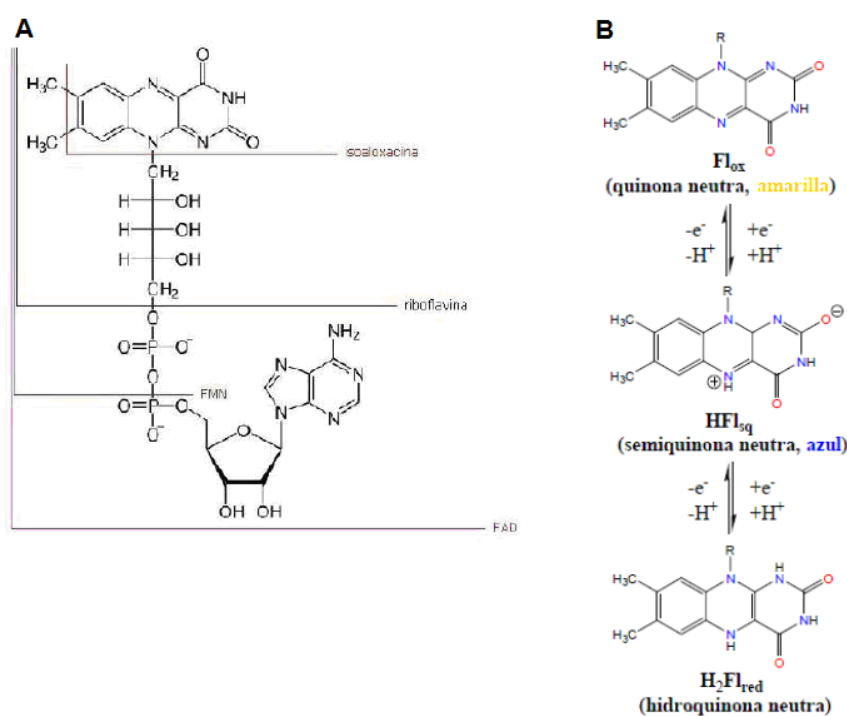


Figura 1. A) Estructura del anillo de isoaloxacina y sus derivados riboflavina, FMN y FAD. B) Esquema de los diferentes estados de óxido-reducción del anillo de isoaloxacina normalmente presentes en las flavoproteínas.

Este cofactor flavínico otorga a la proteína tanto sus propiedades de oxido-reducción como sus propiedades espectroscópicas. Así, las flavoproteínas muestran un espectro característico en el visible que se modifica en función del estado redox de la proteína (Figura 2).

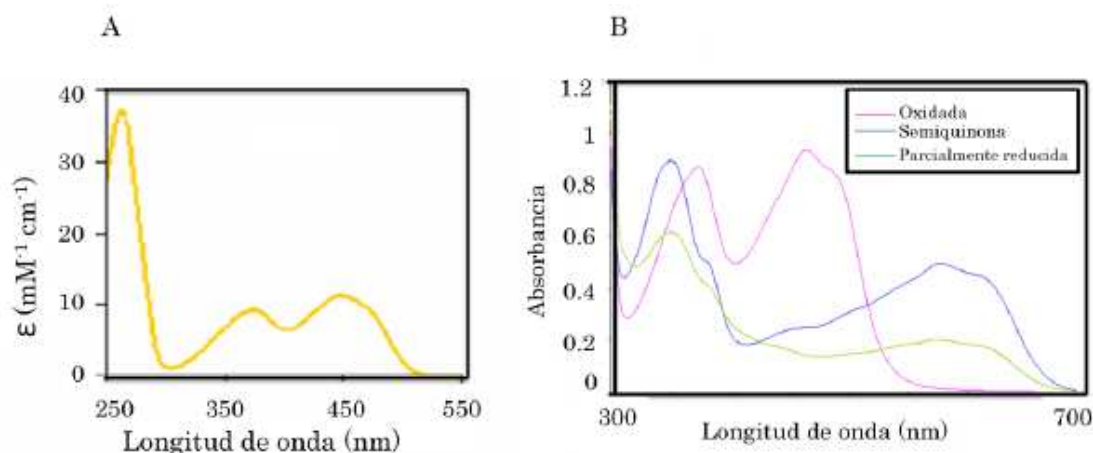


Figura 2. A) Espectro de absorción UV-visible del FAD libre. B) Espectro de absorción UV-visible de una flavoproteína (Flavodoxina, pH7, 25°C) en estado oxidado, semiquinona neutro e hidroquinona.

Entre los compañeros redox más habituales de las flavinas se encuentran NAD^+ y NADP^+ , junto con sus formas reducidas NADH y NADPH . Este grupo de coenzimas presentan gran importancia biológica en los procesos de transformación de energía (Ying, 2008). Constan de una adenosina (fosforilada en 2' de la ribosa en el caso de NADP^+/H), un grupo pirofosfato, una ribosa y un anillo de nicotinamida, capaz de oxidarse o reducirse mediante la captación o cesión de un ión hidruro.

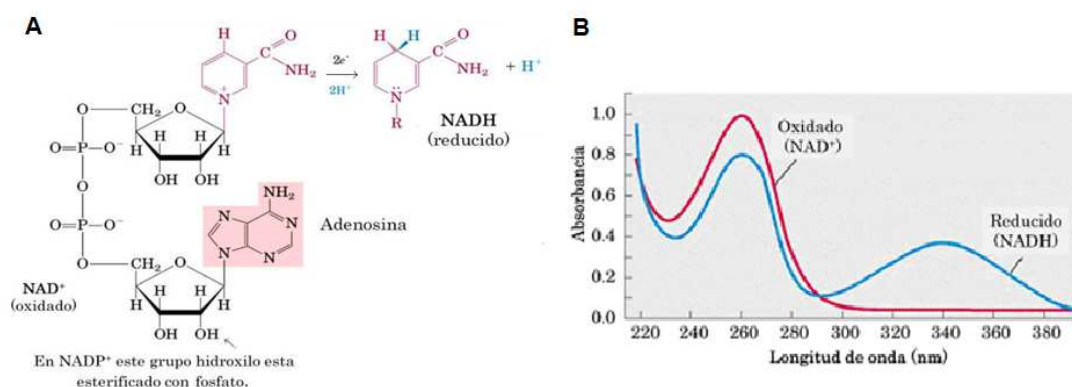


Figura 3. A) Estructura de NAD^+/H . B) Espectro UV-visible de NAD^+/H .

NAD^+/H y NADP^+/H presentan propiedades espectroscópicas similares. La forma reducida presenta máximos a 338 y 259 nm ($\epsilon_{340} = 6.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), mientras que la oxidada presenta un único máximo a 259 nm.

1.2. Apoptosis:

La apoptosis se define como un proceso fisiológico de muerte celular programada en el que se diferencian dos etapas principales (Kerr *et al.*, 1972; Hacker, 2000). En primer lugar se produce una condensación nuclear y citoplásmica en la célula, lo que desemboca en la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos. Los orgánulos se encuentran compactos pero íntegros dentro de estos cuerpos apoptóticos, los cuales pueden contener o no fragmentos nucleares. Finalmente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados y procesados por enzimas lisosomales en los fagosomas.

Hasta la fecha se han descubierto dos rutas apoptóticas principales: la vía mediada por receptores mortales, conocida como extrínseca, y la mitocondrial o también llamada intrínseca (Elmore, 2007). Ambas rutas tienen lugar mediante múltiples mecanismos moleculares y se relacionan entre sí, de forma que los eventos moleculares de una influyen en la otra. Además existe una ruta adicional que implica citotoxicidad mediada por células T y los sistemas perforina/granzima. Estas tres rutas convergen finalmente en la activación de la caspasa 3, que desencadena la degradación celular.

La vía mitocondrial o intrínseca también es conocida como la ruta independiente de caspasas. Las mitocondrias son conocidas principalmente por su papel en la obtención de energía, pero también participan en la muerte celular, no sólo por la pérdida de su función energética sino también por la liberación de proteínas al citosol (van Loo *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2008). Esta liberación se produce como resultado de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la formación de poros en dicha membrana, que permiten el flujo de proteínas a través de ellos en ambas direcciones.

Entre dichas proteínas se encuentra el factor de inducción de apoptosis (AIF), que participa en la ruta independiente de caspasas. En respuesta a un estímulo apoptótico, AIF es liberado del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol. Posteriormente se produce su translocación al núcleo, donde induce la fragmentación del DNA (van Loo *et al.*, 2002; Susin *et al.*, 1999).

1.3. Factor de inducción de apoptosis (AIF):

1.3.1. Descubrimiento, secuencias e isoformas:

El factor de inducción de apoptosis (AIF) fue descrito por primera vez por Susin y colaboradores como una flavoproteína de ~57 kDa con una gran homología con oxidorreductasas de bacterias, plantas y hongos (Susin *et al.*, 1999). Así mismo, encontraron un alto grado de conservación (92% de identidad de aminoácidos) entre AIF humano (hAIF) y de ratón (mAIF), y demostraron que el gen humano de AIF se encuentra localizado en la región Xq 25-26 del cromosoma X, mientras que el de ratón se encuentra en la región A6 del mismo cromosoma (Susin *et al.*, 1999; Daugas *et al.*, 2000).

El transcrito más abundante de AIF, llamado AIF1 o AIF exon2a, se traduce en el citoplasma dando lugar a una proteína de 613 aminoácidos (612 en ratón). AIF1 se pliega dando lugar a tres dominios: dominio de unión a FAD (residuos 123-262 y 401-480), dominio de unión a NADH (residuos 263-400) y dominio C-terminal (residuos 481-613) (Figura 4). Además, presenta una secuencia de localización mitocondrial (MLS) en la región N-terminal y dos secuencias de localización nuclear: NLS1 (residuos 278-301) y NLS2 (residuos 446-452) (Susin *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2002; Lipton *et al.*, 2002). Dicha secuencia de localización mitocondrial dirige su transporte al espacio intermembrana mitocondrial, donde es procesado en su forma madura de 62 kDa (hAIF_{Δ1-54}). Una vez plegada correctamente con su cofactor flavínico, flavín adenín dinucleótido (FAD), se inserta con su extremo N-terminal (aminoácidos 54-102) en la membrana interna, quedando expuesto el resto de la proteína al espacio intermembrana (Otera *et al.*, 2005). Ante un estímulo apoptótico, AIF es procesada por calpaína I y/o catepsinas B, L y S en su forma apoptótica (hAIF_{Δ1-102}), la cual es liberada al citosol y posteriormente translocada al núcleo (Polster *et al.*, 2005). En el núcleo se une al DNA,

lo que induce su fragmentación, la condensación de la cromatina y muerte celular independiente de caspasas (Lipton *et al.*, 2002). Esta actividad pro-apoptótica de AIF requiere la presencia de endonucleasas, ya que AIF carece de un dominio efector de muerte. Algunos estudios sugieren que AIF coopera con la endonucleasa G o con la ciclosporina A (CypA) para provocar cromatinolisis (Zhu *et al.*, 2007; Cande *et al.*, 2004; Kitagawa *et al.*, 2008). Además, la histona H2AX podría ser necesaria para el ensamblaje de un complejo de degradación del DNA en el que intervendrían AIF, CypA y la propia histona (Artus *et al.*, 2010).

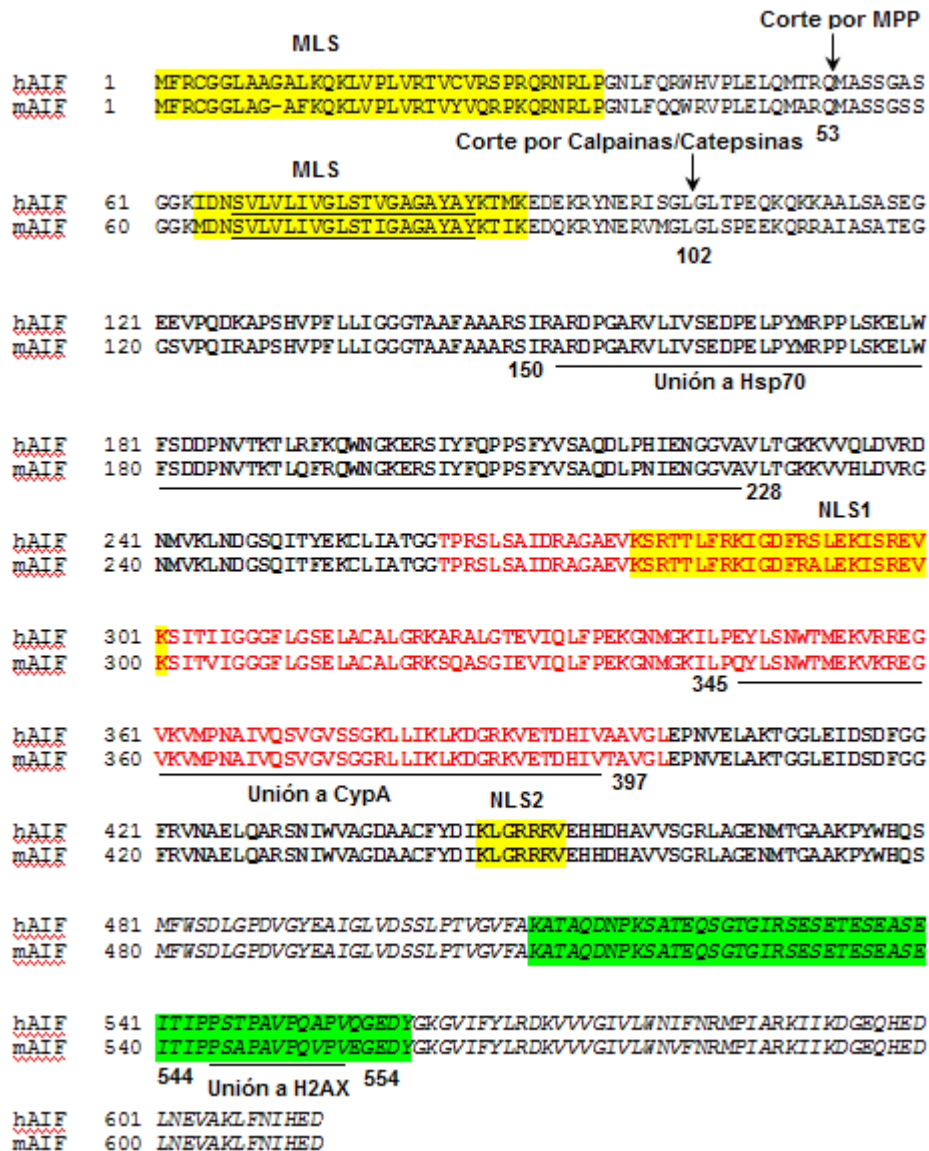


Figura 4. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de AIF humana y de ratón. Los dominios de unión a FAD y NADH y el dominio C-terminal están en negrita, en rojo y en cursiva respectivamente. Las cajas amarillas muestran las secuencias de localización mitocondrial (MLS) y nuclear (NLS); la caja verde indica la secuencia PEST. Los residuos transmembrana están subrayados y las flechas muestran las posiciones de procesamiento y las peptidasas que intervienen. Los códigos del GenBank para AIF humana y de ratón son AF100928 y AF100927, respectivamente (Figura modificada de Ferreira *et al.*, 2012).

Estudios posteriores han mostrado la existencia de al menos dos variantes más de hAIF: AIF2 o AIF-exon2b (Loeffler *et al.*, 2001), que contiene un exón alternativo 2b frente al

exón original 2, y AIFsh (Delettre *et al.*, 2006), que se produce a partir de un inicio de transcripción alternativo situado en el intrón 9 de AIF. Se ha visto que AIF2 presenta la misma función que AIF1 y también se encuentra en la membrana interna mitocondrial, anclándose de forma más fuerte a dicha membrana. Sin embargo, AIFsh es una proteína citosólica que provoca los mismos efectos apoptóticos que AIF1 pero carece de función óxido-reductasa. También se han generado otras dos isoformas humanas, AIFsh2 y AIFsh3, que también presentan el exón alternativo 9b. AIFsh2 contiene los residuos 1-322, mientras que AIFsh3 está formada por los residuos 87-322, es decir, ambas carecen del dominio C-terminal y de NLS2, y por ello no son translocadas al núcleo. AIFsh3 también carece de la secuencia MLS y por consiguiente tampoco es translocada a la mitocondria (Delettre *et al.*, 2006) (Figura 5).

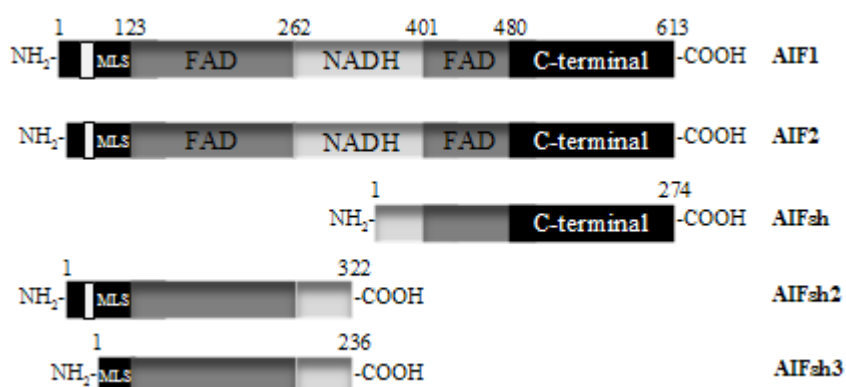


Figura 5. Isoformas descritas de AIF y representación de sus dominios (Ferreira *et al.*, 2012)

1.3.2. Función óxido-reductasa:

Además de su participación en la vía apoptótica mitocondrial, AIF presenta actividad NAD(P)H óxido-reductasa gracias a su cofactor FAD. Existe una gran controversia sobre qué papel desempeña la actividad óxido-reductasa en el espacio intermembrana de la mitocondria en condiciones no apoptóticas. Se cree que es esencial para la obtención de energía en las mitocondrias, así como para el funcionamiento óptimo de la cadena respiratoria (Miramar *et al.*, 2001; Sevrioukova, 2011). También se ha sugerido su implicación tanto en la eliminación de radicales libres (Klein *et al.*, 2002) como en su formación. Además, algunos estudios relacionan su función redox con la biogénesis y/o ensamblaje de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa, así como con el mantenimiento de las funciones de estos complejos (Vahsen *et al.*, 2004) (Figura 6).

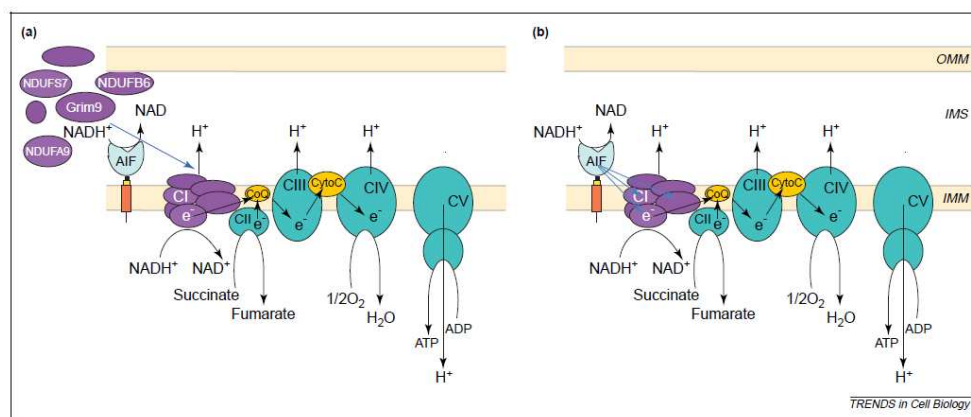


Figura 6: a) Esquema de la participación de AIF en el ensamblaje del complejo I. b) Esquema de la participación de AIF en el mantenimiento de los complejos respiratorios (Modjtahedi *et al.*, 2006).

La primera caracterización *in vitro* de la actividad óxido-reductasa de AIF se realizó con la forma truncada de ratón mAIF $_{\Delta 1-120}$ (Miramar *et al.*, 2001). Se vio que mAIF $_{\Delta 1-120}$ es capaz de catalizar la transferencia de electrones a baja velocidad entre NAD(P)H y pequeños aceptores de electrones o citocromo c, y que esta transferencia se acompañaba por la formación de complejos de carga (CTC). Posteriormente se caracterizaron las formas mAIF $_{\Delta 1-53}$ y mAIF $_{\Delta 1-101}$, las cuales presentaron también baja velocidad de transferencia y formación de CTC (Churbanova *et al.*, 2008). Todas estas formas mostraron preferencia por NADH frente a NADPH, y fueron capaces de intercambiar electrones con aceptores de uno o dos electrones. Además, la reducción con NADH provoca una transición de monómero a dímero, lo que significa que AIF podría participar en vías de señalización celular (Sevrioukova, 2009).

Por otra parte, cabe destacar que todavía no se ha podido establecer qué relación hay entre la actividad óxido-reductasa y la apoptótica. Inicialmente se sugirió que eran independientes entre sí, ya que el precursor de AIF recombinante se vuelve apoptogénico incluso en ausencia de FAD (Susin *et al.*, 1999), y ni la adición de NAD(P)H ni la inhibición de la actividad óxido-reductasa alteran la actividad apoptogénica de AIF (Miramar *et al.*, 2001). Además, AIFsh (Delettre *et al.*, 2006) presenta actividad apoptótica pese a carecer de actividad óxido-reductasa, mientras que AIFsh2 (Delettre *et al.*, 2006) presenta actividad óxido-reductasa pese a carecer de actividad apoptótica. Sin embargo, actualmente se piensa que ambas funciones están relacionadas, ya que la dimerización de AIF mediada por la reducción con NADH produce una reorganización estructural de los dominios proapoptóticos, impidiendo el acceso a las secuencias de unión al DNA y a NLS2. Además, las formas monomérica y dimérica se consideran dos formas funcionales diferentes de AIF. Estudios realizados por Churbanova y colaboradores (Churbanova *et al.*, 2008) sugieren que la forma predominante en la mitocondria en condiciones fisiológicas sería la forma dimérica, y que probablemente AIF forma parte de un complejo multimérico. Además, los cambios en los niveles de NADH podrían afectar al estado oligomérico, lo que alteraría las interacciones de AIF con otras proteínas no sólo en la mitocondria sino también en el citoplasma y en el núcleo. Bajo condiciones apoptóticas se suele producir una bajada en los niveles mitocondriales de NADH. Esto podría aumentar la presencia de la forma monomérica, que es más susceptible a proteólisis en el N-terminal y a la translocación al citosol para producir apoptosis. Todo esto indicaría que la función apoptótica de AIF

estaría controlada por su actividad óxido-reductasa (Churbanova *et al.*, 2008; Sevrioukova, 2009; Sevrioukova, 2011).

1.3.3. Estructura molecular de AIF:

Se han determinado varias estructuras cristalográficas de AIF en su estado natural, tanto de la forma humana (residuos 128-608 en el PDB 1M61, Ye *et al.*, 2002) (Figura 7) como de la de ratón (residuos 121-610 en el PDB 1GV4, Maté *et al.*, 2002; residuos 128-610 en el PDB 3GD3, Sevrioukova, 2009). En todas ellas se observan tres módulos: los dominios de unión a FAD y NADH muestran un plegamiento tipo Rossman, mientras que el dominio carboxilo terminal está compuesto por cinco hojas beta antiparalelas (residuos 478-579) seguidas de dos hélices alfa (residuos 580-610). Además, en el dominio C-terminal de la forma oxidada de AIF, tanto en la humana como en la de ratón, se han encontrado varios motivos desordenados que no se han podido resolver (residuos 540-559 y 546-553 en los PDB 1M6I y 3GD3, respectivamente).

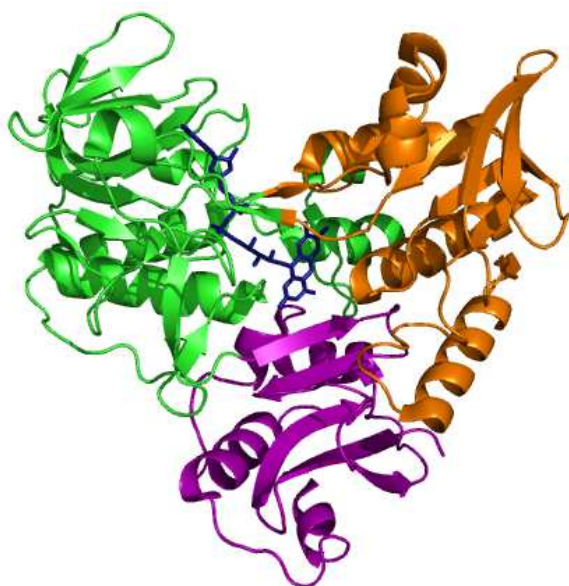


Figura 7: Estructura cristalográfica de AIF humana (Ye *et al.*, 2002). Se representa en verde el dominio de unión a FAD, en naranja el dominio de unión a NADH y en morado el dominio C-terminal. El cofactor FAD, en su forma natural oxidada, se representa en color azul.

Como ya se ha mencionado anteriormente, AIF tiene como grupo prostético una molécula de FAD unida de forma no covalente por molécula de proteína, lo que le permite participar en procesos de óxido-reducción. Su anillo de isoaloxacina se estabiliza en la interfase entre los tres dominios y es parcialmente accesible por el solvente, mientras que la adenosina, el grupo pirofosfato y el ribitol del FAD están en contacto con el dominio de unión a FAD (residuos 138-140, 164, 232, 258-260 y 403).

Esta disposición estructural de AIF es similar a la de las reductasas bacterianas de ferredoxina, que son sus homólogos más cercanos evolutivamente. Sin embargo, AIF se diferencia principalmente de dichas reductasas por la presencia de un bucle extra en el C-terminal (residuos 510-560 en hAIF), que le proporciona su función apoptótica (Maté *et al.*, 2002). Este bucle contiene una secuencia PEST (residuos 529-560 en hAIF) y una secuencia rica en prolinas (residuos 544-554 en hAIF). Ambas secuencias suelen estar involucradas en interacciones proteína-proteína, y se ha sugerido su participación en la

unión con CypA (Artus *et al.*, 2010). Esta unión permitiría el transporte de AIF al núcleo y la cromatinólisis del DNA.

También se ha determinado la estructura de la forma reducida por NADH de AIF de ratón (residuos 128-610 en el PDB 3GD4, Sevrioukova, 2009) (Figura 8A). Tras la reducción por NADH se observa la dimerización de AIF y la formación de complejos de transferencia $\text{FADH}_2\text{-NAD}^+$ muy estables. Según esta estructura, la estabilización del CTC se debe a tres motivos: (i) las interacciones de apilamiento entre los anillos de nicotinamida, isoaloxazina y F309 (F310 en la forma humana) (Figura 9); (ii) la redistribución de un gran número de residuos aromáticos situados en el C-terminal, probablemente actuando como un sitio de deslocalización electrónica; (iii) una amplia red de enlaces de hidrógeno en la que participa His453 (His454 en hAIF), un residuo clave que sufre un cambio conformacional para interaccionar y orientar de forma óptima la nicotinamida, favoreciendo la transferencia de carga. Estos cambios en el centro activo se transmiten a la superficie de AIF provocando la dimerización y restringiendo el acceso a NLS2. Además, el dímero formado está estabilizado por una serie de puentes salinos entre los residuos E412, R421 y R429 (E413, R422 y R430 de la forma humana) (Figura 8B). Todos estos datos apoyan la hipótesis de que tanto la función mitocondrial como la apoptótica están reguladas por NADH (Sevrioukova, 2009).

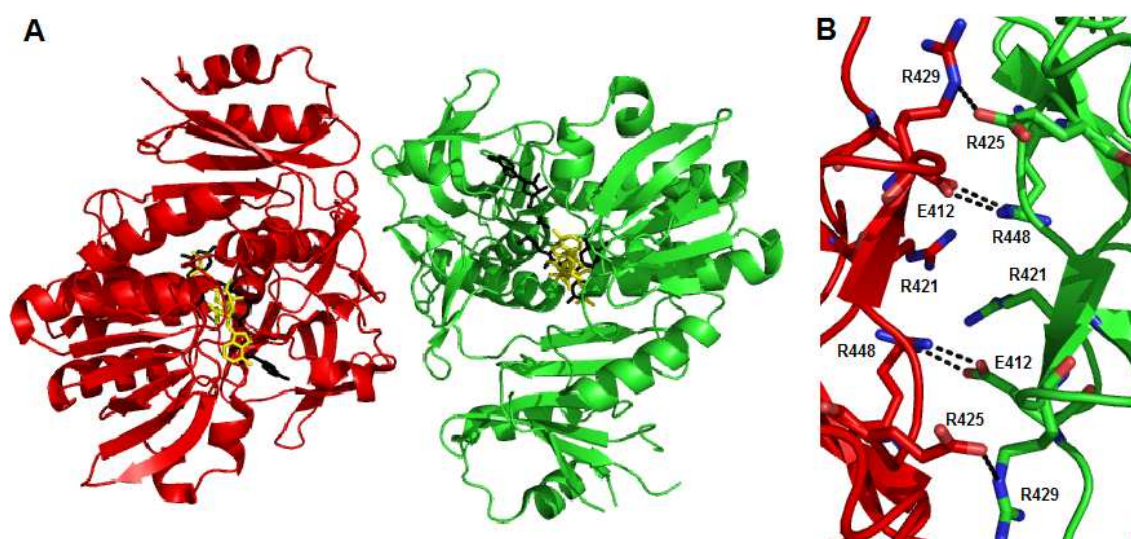


Figura 8: A) Estructura cristalográfica del dímero $\text{mAIF}_{\text{red}}\text{:NAD}^+$ (PDB 3GD4). Las dos moléculas de AIF se representan en verde y rojo. El cofactor FADH_2 se muestra en negro y la coenzima NAD^+ en amarillo. B) Modelado de las interacciones entre algunos residuos presentes en la zona de unión del dímero a partir del dímero $\text{mAIF}_{\text{red}}\text{:NAD}^+$ (PDB 3GD4).

Gracias a la estructura cristalográfica de mAIF en estado reducido por NADH, se puede predecir el lugar de unión del anillo de nicotinamida del piridín nucleótido en el entorno del anillo de isoaloxacina del FAD. De esta forma se puede predecir un modelo de interacción entre la enzima y el coenzima para la proteína humana. Así, el centro catalítico está formado por los residuos W483, F310, P173, H454, E314 y K177 (Figura 9). Estos dos últimos residuos no se han estudiado en este trabajo ya que las mutaciones realizadas en estos residuos (Villanueva, 2010) generaron proteínas inestables.

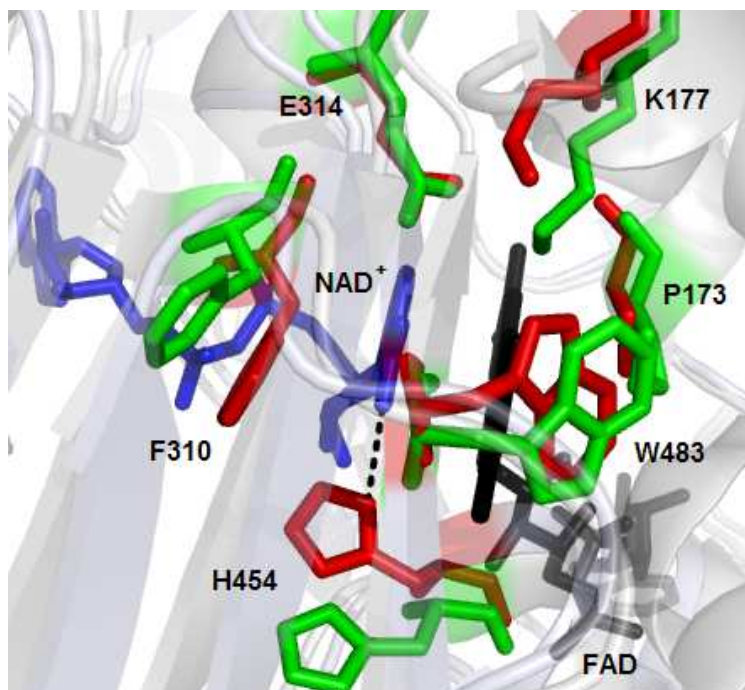


Figura 9. Centros activos superpuestos de mAIF reducida por NADH (pdb 3GD4) y la forma oxidada de hAIF (pdb 1M6I). Se muestra en color negro el cofactor FADH₂ y en azul la coenzima NAD⁺. Se muestran en verde los residuos del centro activo correspondientes a la forma oxidada y en rojo los residuos correspondientes a la forma reducida. Los guiones muestran una nueva interacción entre H454 y NAD⁺ tras la reducción de AIF.

Esta figura muestra los desplazamientos de algunos residuos del centro activo como consecuencia de la reducción de la proteína. Por ello se cree que estos residuos podrían estar modulando la reacción de transferencia de hidruro entre el NADH y la proteína, afectando por tanto a las propiedades de óxido-reducción de AIF. En este trabajo se propone estudiar el papel de los residuos W483, F310, P173 y H454, todos ellos pertenecientes al centro catalítico, así como el efecto producido por los residuos E413, R422 y R430, que participan en la dimerización de AIF. Estos tres últimos residuos fueron sustituidos por alaninas, lo que altera de forma notable la presencia de cargas y puentes estabilizadores de la dimerización. Estudios paralelos realizados por el grupo de investigación han comprobado que dichas mutaciones impiden la dimerización. Por otra parte, y con respecto al centro catalítico, el residuo W483 fue sustituido por una glicina. Se espera que este cambio afecte al entorno del anillo de isoaloxacina, ya que aumenta la polaridad del centro activo e impide la estabilización por el anillo indol del triptófano. También se sustituyó por glicina el residuo F310, lo que aumenta el espacio de unión de la nicotinamida en el centro catalítico. El cambio de P173 por glicina dota de mayor flexibilidad al FAD. Por último, el intercambio de H454 por serina impide que el cambio conformacional de la histidina, mostrado en la figura 9, oriente al NADH para la formación del complejo catalíticamente competente.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es caracterizar la función óxido-reductasa de las formas humanas mitocondrial y apoptótica de AIF (hAIF $_{\Delta 1-54}$ y hAIF $_{\Delta 1-102}$). Para alcanzarlo, en este trabajo se ha planteado la consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Expresar, producir y caracterizar la forma mitocondrial hAIF $_{\Delta 1-54}$, y comparar su funcionalidad con respecto a hAIF $_{\Delta 1-102}$.
2. Determinar la actividad óxido-reductasa de hAIF $_{\Delta 1-102}$ con distintos aceptores de electrones.
3. Determinar el papel de los residuos del centro activo, así como de los residuos implicados en el proceso de dimerización. En concreto, el papel de los residuos W483, F310, P173 y H454, pertenecientes al centro activo, y E413, R422 y R430, vinculados a la dimerización.

Además, se ha planteado como objetivo secundario expresar y optimizar las condiciones de cultivo de la forma trunca hAIF $_{\Delta 1-340}$. Esta forma carece del dominio de unión a FAD y por ello no presenta actividad óxido-reductasa, por lo que se utilizará en estudios posteriores para lograr un mejor entendimiento de la relación entre la función apoptótica y la actividad óxido-reductasa de AIF.

3. Materiales y métodos

3.1. Material biológico

Para la expresión heteróloga de hAIF $_{\Delta 1-102}$, de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, y de hAIF $_{\Delta 1-54}$ y hAIF $_{\Delta 1-340}$ se utilizó la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* con el vector de expresión pET28 α -a(+). Los correspondientes cDNAs fueron clonados entre las dianas NdeI y NotI, permitiendo obtener una proteína de fusión que además presenta una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal. El vector además confiere resistencia a kanamicina. Los plásmidos que contienen los genes de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y los mutantes W483G, P173G y F310G fueron cedidos por la Dra. Miramar (Miramar *et al.*, 2001), mientras que el plásmido que contiene hAIF $_{\Delta 1-340}$ fue cedido por el Dr. Susín. Los plásmidos que contienen el cDNA de H454S, E413A/R422A/R430A y hAIF $_{\Delta 1-54}$ fueron producidos por Mutagenex[®].

3.2. Expresión de hAIF $_{\Delta 1-102}$, de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, y de las variantes hAIF $_{\Delta 1-54}$ y hAIF $_{\Delta 1-340}$

3.2.1. Transformación

Para obtener células competentes se partió de cultivos de *E. coli* BL21 y DH5 α en LB-agar, de los que se tomó una colonia aislada para inocular 10 ml de LB a 37°C y 200 rpm durante toda la noche. A la mañana siguiente se inocularon 200 ml de LB a 37°C y 200 rpm con 2 ml del pre-inóculo, hasta alcanzar una D.O._{600nm} = 0,35-0,45. Se incubó 20 minutos en hielo y se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm, 4°C. Se resuspendió el pellet celular en 40 ml de Buffer 1 (CaCl₂ 100mM, MgCl₂ 70 mM y NaAc 40 mM) y se centrifugó 15 minutos a 4000 rpm, 4°C. Se desechó nuevamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 4 ml de Buffer 2 (CaCl₂ 100 mM, glicerol 15%). Finalmente se tomaron alícuotas de 200 μ l y se conservaron a -80°C.

Para transformar se añadieron 3 μ l del plásmido correspondiente de AIF sobre 100 μ l de células competentes, de tipo BL21 o DH5 α . La mezcla se dejó en hielo 15 minutos, se incubó 50 segundos a 42°C y se mantuvo otra vez 2 minutos en hielo. Se incubó 1,5 horas a 37°C, 180 rpm en 1 ml de LB y se sembró en LB-agar con kanamicina (30 mg/L), incubando toda la noche a 37°C. Finalmente se tomó una colonia aislada de estas placas para iniciar un nuevo cultivo líquido en LB con kanamicina, del cual se guardaron células en alícuotas de 100 μ l al 20% en glicerol. Las células BL21 transformadas se guardaron para iniciar cultivos a gran escala, mientras que las DH5 α transformadas se utilizaron para mantener estable el plásmido de cada variante de AIF.

3.2.2. Pruebas de expresión

Éstas sólo se realizaron con hAIF $_{\Delta 1-54}$ y hAIF $_{\Delta 1-340}$, ya que las condiciones óptimas de cultivo del resto de mutantes se habían determinado previamente (Villanueva, 2010). Se inoculó una colonia aislada en 10 ml de medio LB o TB con kanamicina (30 mg/L) y se incubó toda la noche a 30 ó 37°C. Se inocularon 40 μ l de estos cultivos en otros 10 ml de LB con kanamicina (30 mg/L), y se cultivaron a la misma temperatura hasta obtener una D.O._{600nm} = 0,8. Se indujeron con IPTG (1 mM), y se incubaron a distintos tiempos: 3,5 horas (sólo a 37°C) o toda la noche (30 ó 37°C). Se recogieron las células y se

resuspendieron en 1 ml de fosfato 50 mM, pH 8. Las células se trataron con un sonicador Up200S (Hielscher), realizando 6 ciclos de 30 segundos con 30 segundos de descanso entre ellos. A continuación se centrifugó a 10000 rpm, 4°C durante 5 minutos para separar pellet y sobrenadante, resuspendiendo el pellet en 1 ml de fosfato 50 mM, pH 8. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page) para ver el contenido en AIF de la fracción soluble y del pellet. Para ello se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%, según el método de Laemmli (Laemmli, 1970), en un sistema Mighty Small II (Amersham Biosciences).

3.2.3. Cultivo a media escala

Se tomaron colonias conservadas a -80°C en glicerol al 20% para inocular 500 ml de medio LB con kanamicina (30 mg/l) y riboflavina (8 mg/l), y se incubó en las condiciones óptimas de las pruebas de expresión. Al día siguiente se inocularon 9 litros de medio LB suplementado con kanamicina (30 mg/l) y riboflavina (8 mg/l), y se incubaron en idénticas condiciones hasta alcanzar una D.O._{600nm} = 0.8-1, momento en el que se añadió IPTG (1 mM). Tras la inducción, los cultivos se incubaron según su tiempo óptimo. Se recogieron las células y se guardaron a -20°C hasta ser utilizadas.

3.3. Purificación de hAIF_{Δ1-102}, de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, y hAIF_{Δ1-54} y hAIF_{Δ1-340}

La purificación de hAIF se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando el gel IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) activado con níquel. El pellet celular fue resuspendido en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8, 10% glicerol, y las células se lisaron mediante 10 ciclos de sonicación de 30 segundos con 30 segundos de descanso con el sonicador Up200S (Hielscher). Se centrifugó eliminando el pellet y se añadió imidazol al 4% y KCl 0,4M sobre el extracto crudo, que se incubó 1,5 horas a 4°C en agitación con el gel de afinidad activado. Finalmente se cargó la disolución en la columna y se lavó con 3 volúmenes de fosfato 50 mM, pH 8, 10% glicerol, 40 mM imidazol. La elución de la proteína se realizó mediante un gradiente de imidazol entre 40 mM y 500 mM en fosfato 50 mM, pH 8, 10% glicerol. La razón de pureza (Abs₂₈₀/Abs₄₅₀) para hAIF_{Δ1-102} es 12, de forma que los extremos que se alejaban de este valor se recogieron en pools diferentes. Para los mutantes esta razón de pureza variaba un poco, tomándose siempre el pool central como el mejor. La proteína se dializó en fosfato 50 mM, pH 8 y se concentró en centricones (MW 10.000). Se conservó congelada a -80°C con un 20% de glicerol hasta su utilización.

En la purificación de hAIF_{Δ1-54} sólo se obtuvo la apoproteína, por lo que se realizaron varias pruebas con el fin de reconstituir la proteína. Las condiciones de cultivo iniciales (LB, 37°C, tiempo de inducción 18 horas) se alteraron con el fin de favorecer la formación del cofactor. De este modo, se llevaron a cabo dos cultivos diferentes: en LB a 37°C, induciendo durante 10 horas a esta misma temperatura; y en LB a 30°C, induciendo 18 horas a 16°C. A partir de estos cultivos se obtuvo nuevamente la proteína sin el cofactor, por lo que se decidió incubar la proteína obtenida en estos cultivos (11.54 nM) con un exceso de FAD (300 nM) en tripa de diálisis, frente a una disolución de fosfato 50 mM, pH 8. La concentración de hAIF_{Δ1-54} fue determinada por el método de Bradford, usando BSA como estándar.

Se comprobó la posible incorporación del cofactor a hAIF_{Δ1-54} en un diodo Hewlett Packard. Tras comprobar que la proteína seguía en forma de apoproteína, se tomaron dos fracciones de la proteína, de las cuales una fue tratada con trombina para eliminar la cola de histidinas. Posteriormente se trataron por separado ambas fracciones con urea 4 M en fosfato 50 mM, pH 8, FAD 300 nM. Estas fracciones se dializaron en fosfato 50 mM, pH 8 con el fin de eliminar la urea y permitir el replegamiento. Por último, se tomaron medidas de dichas fracciones de proteína en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible.

3.4. Caracterización espectroscópica de hAIF_{Δ1-102} y mutantes

3.4.1. Espectros UV-visible de hAIF_{Δ1-102} y mutantes, y determinación de sus coeficientes de extinción

Los espectros UV-visible de la enzima nativa hAIF_{Δ1-102} y de sus mutantes se obtuvieron en fosfato 50 mM, pH 8 en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible o en un diodo Hewlett Packard. Para determinar los coeficientes de extinción molar de hAIF_{Δ1-102} y de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, se desnaturalizó la proteína en Guanidina/HCl 3 M y se midió la absorbancia del cofactor libre a 450 nm. Por medio de la ley de Beer-Lambert, se determinó la concentración del cofactor libre, utilizando para ello el valor de su coeficiente de extinción ya descrito en cloruro de guanidinio ($\epsilon_{\text{FAD}} = 11900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentración hallada para el cofactor coincide con la de AIF, ya que la estequiometría es 1:1. Finalmente se determinó el valor del coeficiente de extinción de cada variante sustituyendo en la ley de Beer-Lambert el valor de absorbancia obtenido para la proteína plegada y la concentración determinada con el cofactor libre. El valor de absorbancia utilizado se corresponde con el obtenido en el máximo de absorbancia de la banda I de cada variante, el cual se sitúa en torno a 450 nm y varía para cada mutante.

Los valores determinados para los coeficientes de extinción se utilizan para cuantificar la concentración de proteína de cada variante en los distintos experimentos de este proyecto.

3.4.2. Espectroscopía diferencial

Se utilizó para determinar la unión entre la enzima nativa hAIF_{Δ1-102} y NAD⁺. Para ello se analizaron las diferencias espectrales motivadas por la formación del complejo hAIF:NAD⁺. Se utilizó un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible de doble haz y cubetas con dos compartimentos. Ambas cubetas contenían inicialmente hAIF (7 μM) en tampón fosfato 50 mM, pH 8 en uno de los compartimentos, y el mismo tampón libre de proteína en el otro. Tras registrar en esas condiciones la línea base, se realizaron sucesivas adiciones del ligando NAD⁺ (0 - 4.5 mM), añadiendo cada vez el mismo volumen en ambas cubetas; en la de referencia se adicionó sobre la disolución tampón, mientras que en la de muestra se añadió sobre la disolución de proteína. Se tomaron medidas tras cada adición, de forma que los espectros obtenidos correspondieron a la diferencia entre el espectro de absorción de hAIF_{Δ1-102} unida a NAD⁺ y la suma de los espectros de las dos especies libres. De este modo, sólo se detectaron los cambios de absorbancia debidos a la unión.

3.5. Caracterización de la actividad óxido-reductasa de hAIF_{Δ1-102} y de sus mutantes

3.5.1. Caracterización cinética en estado estacionario

Se ensayó la capacidad de hAIF_{Δ1-102} para catalizar la reducción *in vitro* de tres aceptores artificiales (1,4-benzoquinona, 1,2-naptoquinona y coenzima Q1) y uno natural (coenzima Q10) en presencia de β-NADH. Los ensayos se realizaron con una concentración 75 nM de AIF y 200 μM de cada quinona. La concentración ensayada de NADH también fue 200 μM, dado que el uso de concentraciones más elevadas inhibía la reacción, llegando en algunos casos a impedir la detección de la actividad. Al trabajar en condiciones no saturantes sólo pudo determinarse la actividad aparente de la enzima.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-visible. Las reacciones se siguieron a 340 nm, midiendo la variación de absorbancia por unidad de tiempo debida a la oxidación de NADH. Finalmente se utilizó el valor del coeficiente de extinción del NADH ($\epsilon_{340} = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y la variación de absorbancia para determinar la actividad aparente de AIF. Para ello se utilizó la ley de Beer-Lambert modificada del siguiente modo:

$$\text{Act. aparente (min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta Abs_{340nm} \text{ (min}^{-1}\text{)}}{\epsilon_{NADH} (\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l(\text{cm}) \cdot C_{AIF} (\mu\text{M})}$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción de NADH a 340 nm, l es la longitud de la cubeta y C_{AIF} es la concentración de AIF en el ensayo.

3.5.2. Caracterización cinética en estado pre-estacionario

Las reacciones de cinética rápida entre las distintas variantes de AIF y NADH se siguieron en condiciones anaeróbicas mediante un equipo de mezcla rápida con flujo detenido *Applied Photophysics* SX17.MV, al que se acopló un detector de diodos que registró los espectros de absorbancia durante el tiempo de medida entre 340 y 1000 nm. Los datos de los espectros fueron recogidos mediante el software X-SCAN (*Applied Photophysics*).

El equipo de mezcla rápida con flujo detenido tiene dos jeringas idénticas en las que se introducen la proteína y el ligando, y cuyos émbolos se acoplan a un pistón movido por aire comprimido. Las salidas de ambas jeringas, tras pasar por una válvula, se juntan y llegan a una cámara de mezcla, que desemboca en una jeringa de parada (Figura 10). El proceso se inicia vaciando la jeringa de parada, seguido de un empuje repentino del pistón de empuje que hace que los émbolos de ambas jeringas avancen a la vez liberando un volumen equivalente al vaciado en la jeringa de parada. El contenido de las jeringas se mezcla en la salida y el producto se detiene en la cámara de medida. Esto permite seguir la evolución espectroscópica de la mezcla a lo largo del tiempo.

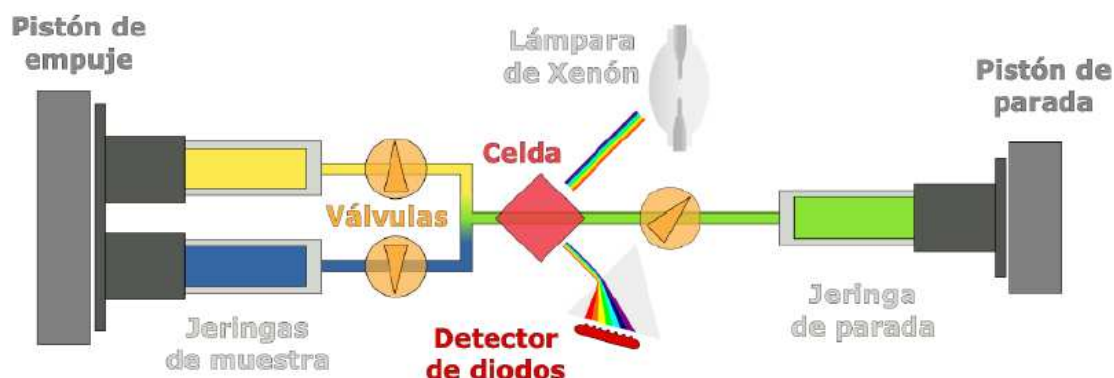


Figura 10. Esquema de aparato de flujo detenido acoplado a un sistema policromático

En primer lugar se prepararon todos los reactivos en condiciones anaeróbicas utilizando un tren de anaerobiosis, el cual está conectado a una bomba de vacío y a una de argón. El argón se pasa por un catalizador para evitar trazas de oxígeno. Las muestras se preparan en tonómetros, que son tubos de vidrio con una llave en cada extremo. La superior se adapta al tren de anaerobiosis y la inferior a la entrada del aparato de mezcla rápida. Para conseguir la anaerobiosis, se hacen ciclos sucesivos de argón y vacío que desplazan el oxígeno presente inicialmente en las muestras.

Para mantener las condiciones anaeróbicas en el aparato de mezcla rápida se hicieron tres lavados (18 disparos) en ambas jeringas con ditionito sódico, que elimina las trazas de oxígeno presentes en el equipo de mezcla rápida. A continuación se realizaron tres lavados (18 disparos) con tampón fosfato 50 mM, pH 8, también en ambas jeringas. Se cargó la proteína (10 μ M) en una de las jeringas manteniendo tampón en la otra para obtener un espectro propio de la proteína antes de la adición de NADH. Finalmente se realizó la reducción de cada variante de AIF por adición de concentraciones crecientes de NADH en exceso (78 μ M – 20 mM).

Los espectros obtenidos en la reducción de AIF se analizaron en el programa Pro-Kineticist (Applied Photophysics). Cada espectro se cargó en este programa y se analizó individualmente, ajustándolo al modelo más sencillo que representara un ajuste coherente tanto de la velocidad de reacción como de las especies generadas durante la reacción. Según las variantes de AIF, se hicieron ajustes a modelos cinéticos de una etapa, $A > B$, o dos etapas, $A > B > C$, lo que permitió determinar el valor de la constante observada para la cinética de reacción. Representando los valores de esta constante en función de la concentración de NADH, se pudo determinar los valores de las constantes de transferencia de hidruro (k_{red}) y de disociación (K_d) para la reducción de cada variante de AIF con NADH. Para la determinación de ambas constantes se realizó un ajuste a la siguiente ecuación:

$$k_{obs} = \frac{k_{red} \cdot S}{K_d + S}$$

donde S representa la concentración de NADH utilizada.

4. Resultados

4.1. Expresión y purificación de hAIF $_{\Delta 1-102}$, de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A, y de hAIF $_{\Delta 1-54}$ y hAIF $_{\Delta 1-340}$

4.1.1. Expresión y purificación de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y de sus mutantes W483G, P173G, F310G, H454S y E413A/R422A/R430A

Para la expresión de la proteína nativa y de los mutantes caracterizados en este trabajo se partió de colonias previamente transformadas por el grupo de investigación. Estas colonias se cultivaron a gran escala en medio LB a 180 rpm, 37°C hasta que el cultivo alcanzó una $D.O._{600\text{ nm}} = 0.8-1$, momento en el que se indujo la expresión de la proteína de interés con IPTG durante 18 horas.

Al finalizar el proceso de cultivo se procedió a la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad con colas de histidina. En primer lugar se sometió a las células a sonicación y tras los centrifugados, se produjo la unión de la proteína a la resina de la columna de afinidad, previamente activada con níquel. Una vez se hubo lavado la columna en las condiciones mencionadas en el apartado 3.4, se provocó su elución con un gradiente de imidazol. Para la purificación de la enzima nativa hAIF $_{\Delta 1-102}$ y de sus mutantes se obtuvo un perfil típico de elución, el cual se muestra en la figura 11 para una de sus variantes. El pico correspondiente a AIF se obtiene al tratar la columna con una disolución al 24-29% imidazol.

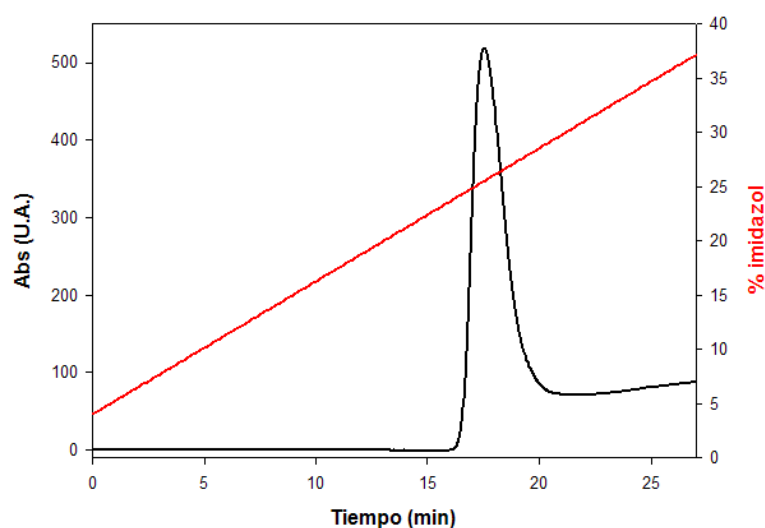


Figura 11. Cromatograma de la purificación de hAIF $_{\Delta 1-102}$ E413A / R422A / R430A, similar al de las otras variantes.

Los espectros de absorción UV-visible de las fracciones correspondientes al pico de elución mostraron el espectro característico de hAIF. Se determinó la razón de pureza de cada fracción mediante el cociente Abs_{280}/Abs_{450} . Este cociente demostró que las fracciones centrales eran las que presentaban una mayor pureza, así como una mayor concentración, y por ello se recogieron dichas fracciones por separado.

4.1.2. Expresión y purificación de hAIF $_{\Delta 1-54}$ y hAIF $_{\Delta 1-340}$

Tras la transformación de células *E. coli* BL21 con los plásmidos pET28 α -hAIF $_{\Delta 1-54}$ y pET28 α -hAIF $_{\Delta 1-340}$, se realizaron las pruebas de expresión de las variantes hAIF $_{\Delta 1-54}$ y hAIF $_{\Delta 1-340}$. Éstas se realizaron en medio LB o TB a 180 rpm, 37°C, dejando pasar 3 ó 18 h en las mismas condiciones tras la inducción con IPTG. También se ensayó la expresión y producción de la proteína en medio LB o TB a 30°C, dejando pasar 18 h tras la inducción con IPTG y manteniendo el cultivo a 180 rpm, 16°C. En las figuras 12 y 13 se muestran los resultados de dichos ensayos de expresión.

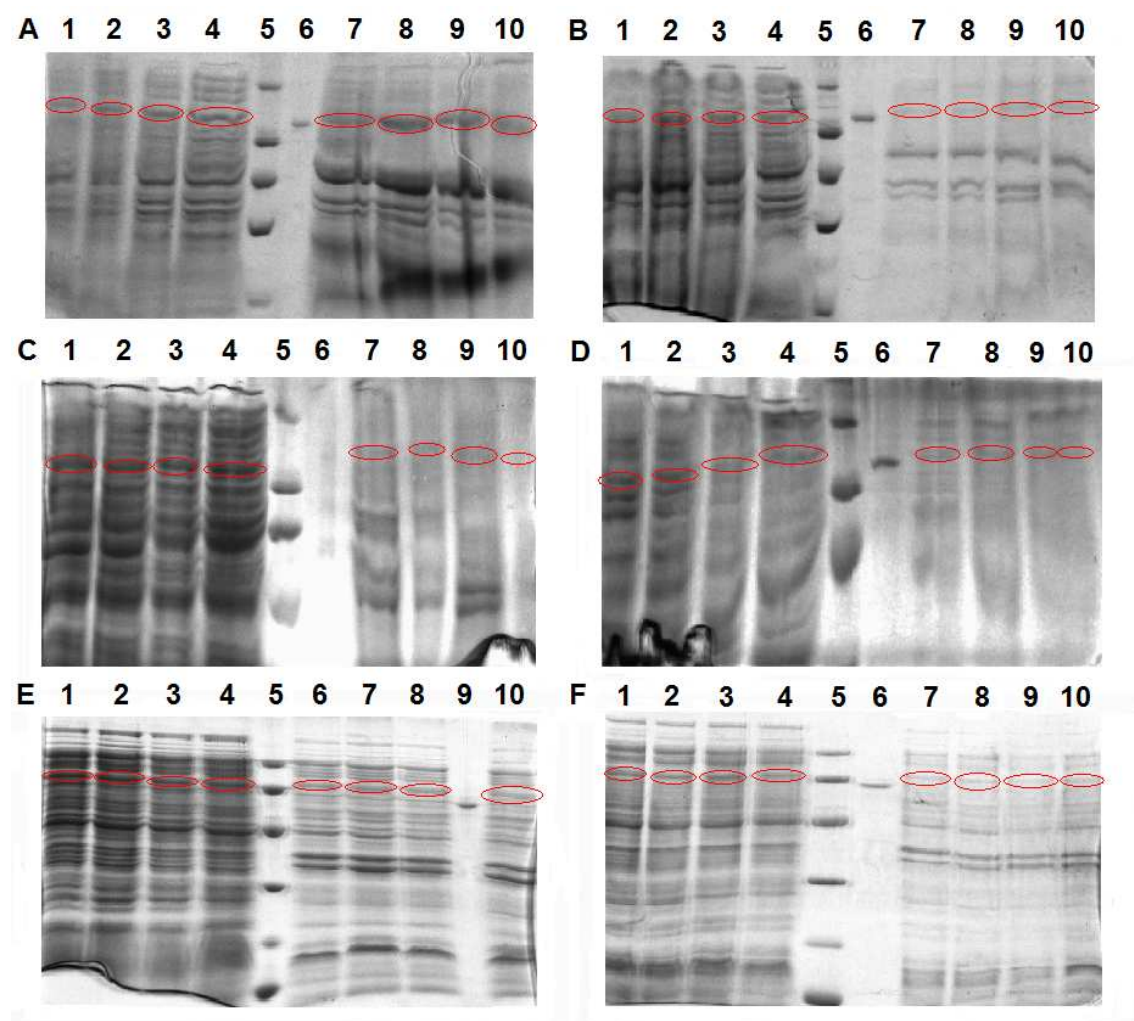


Figura 12. Expresión de hAIF $_{\Delta 1-54}$ en diferentes clones de BL21 y a distintas temperaturas. A) Crecimiento en LB a 37°C, inducción 18h. B) Crecimiento en LB a 37°C, inducción 3h. C) Crecimiento en TB a 37°C, inducción 18h. D) Crecimiento en TB a 37°C, inducción 3h. E) Crecimiento en LB a 30°C, inducción 18h a 16°C. F) Crecimiento en TB a 30°C, inducción 18h a 16°C. En todas ellas los carriles 1-4 corresponden a la parte soluble de 4 colonias diferentes. El carril 5 es el marcador de peso molecular, que muestra 6 bandas de 97, 66, 45, 30, 20.1 y 14.4 kDa de arriba a abajo. El carril 6 corresponde a hAIF $_{\Delta 1-102}$ purificada (1.5 μ M) y los carriles 7-10 corresponden a la parte insoluble de las células, a excepción de la figura E donde los carriles 6 y 9 están invertidos.

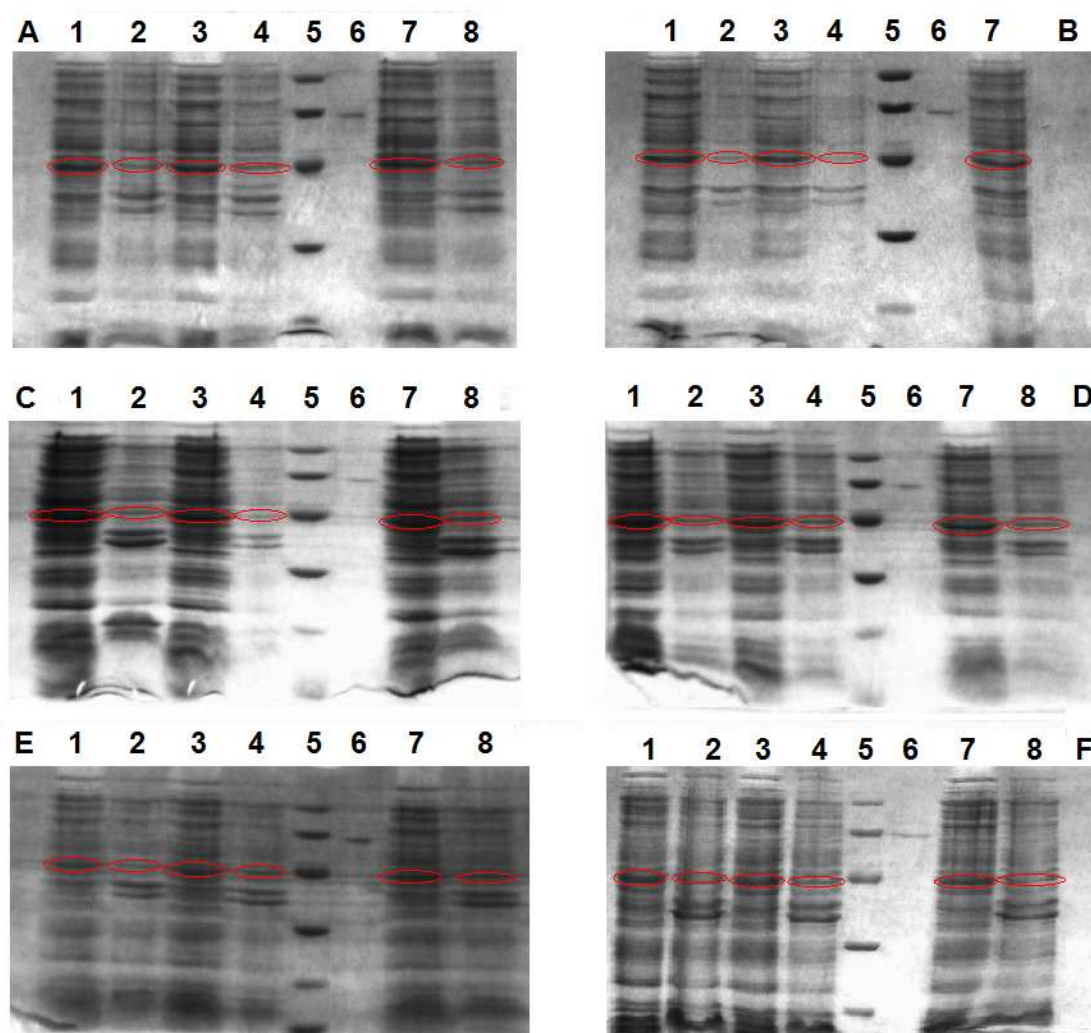


Figura 13. Expresión de hAIF Δ_{1-340} en diferentes clones de BL21 y a distintas temperaturas. A) Crecimiento en LB a 37°C, inducción 18h. B) Crecimiento en LB a 37°C, inducción 3h. C) Crecimiento en TB a 37°C, inducción 18h. D) Crecimiento en TB a 37°C, inducción 3h. E) Crecimiento en LB a 30°C, inducción 18h a 16°C. F) Crecimiento en TB a 30°C, inducción 18h a 16°C. En todas ellas, los carriles impares corresponden a la parte soluble de 4 colonias diferentes, mientras que los pares corresponden a la parte insoluble. El carril 5 es el marcador de peso molecular, que muestra 6 bandas de 97, 66, 45, 30, 20.1 y 14.4 kDa de arriba a abajo. El carril 6 corresponde a hAIF Δ_{1-102} purificada (1.5 μ M).

La banda de proteína correspondiente a hAIF Δ_{1-54} se sitúa a una altura similar a la banda correspondiente a hAIF Δ_{1-102} purificada (figura 12). En este caso, los geles no muestran diferencias entre los cultivos realizados en medio LB o TB, siendo su expresión similar a la obtenida para hAIF Δ_{1-102} (Villanueva, 2010). Además, la reducción del tiempo de inducción supone un descenso en la producción de proteína, por lo que se tomaron como condiciones óptimas el cultivo en LB a 37°C con un tiempo de inducción de 18 horas. Por otra parte, las pruebas de expresión de hAIF Δ_{1-340} desvelan una mayor producción de proteína en el medio de cultivo TB frente a LB. En este caso la banda de proteína se encuentra a la altura de la tercera banda del marcador molecular, con un peso aproximado de 30 kDa, y dicha banda muestra una mayor intensidad cuando las células transformadas se cultivaron en TB a 37°C, con un tiempo de inducción de 18 horas. Sin embargo, la producción de proteína con un tiempo de inducción de 3 horas muestra una producción similar con una menor presencia de proteína en cuerpos de

inclusión. Por tanto, se espera que estas condiciones de cultivo (TB, 37°C, inducción 3h) sean las condiciones idóneas para esta variante.

Ambas variantes muestran una diferencia notable con respecto a hAIF $_{\Delta 1-54}$ y sus mutantes, ya que estos geles demuestran que, aunque la proteína se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble, parte de la proteína está presente en cuerpos de inclusión. Esto contrasta con los resultados obtenidos por el grupo en las pruebas de expresión de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y de sus mutantes, donde toda la proteína se encontraba plegada en la fracción soluble.

Por tanto, se ha logrado la expresión y el establecimiento de un protocolo óptimo para la producción de ambas variantes. Tras alcanzarse los objetivos marcados para hAIF $_{\Delta 1-340}$, no se llevó a cabo su producción a gran escala ya que esta variante se caracterizará en estudios posteriores, comparando su actividad apoptótica con la de hAIF $_{\Delta 1-102}$ con objeto de determinar la relación existente entre la función apoptótica y la de óxido-reducción. Por otra parte, se realizó la producción a gran escala y la purificación de hAIF $_{\Delta 1-54}$ en las condiciones descritas en el apartado anterior. Este proceso mostró un perfil de elución similar al mostrado para hAIF $_{\Delta 1-102}$ y sus variantes, aunque con menor rendimiento (Figura 14A). Además, el espectro de absorción UV-visible de las fracciones purificadas demostró que dichas fracciones no presentaban el cofactor unido, por lo que se hicieron varios ensayos para obtener la holoproteína. En primer lugar se alteraron las condiciones de cultivo (LB, 37°C, tiempo de inducción 18 h) con el fin de favorecer la formación del cofactor. Se llevaron a cabo dos cultivos diferentes: con menor tiempo de inducción (10h) y con temperaturas más bajas (el cultivo a 30°C y la inducción con IPTG a 16°C). La purificación de estos cultivos mostró el mismo perfil, obteniéndose nuevamente la apoproteína, por lo que se incubó ésta con un exceso de FAD. Tras dializar toda la noche, no se produjo la incorporación del FAD, por lo que se decidió separar la proteína en dos fracciones. Una de ellas se trató con trombina para eliminar la cola de histidinas, ya que podría impedir el correcto plegamiento de hAIF $_{\Delta 1-54}$. Hay que tener en cuenta que esta variante presenta 48 residuos extra en el extremo N-terminal, en el que también está presente la secuencia de histidinas, por lo que podría afectar a su plegamiento. Posteriormente se trataron ambas fracciones por separado con urea 4 M, FAD 300 nM, en fosfato 50 mM, pH 8. Estas fracciones se dializaron en fosfato 50 mM, pH 8 para eliminar el exceso de urea y permitir el replegamiento. Sin embargo, el espectro final de la proteína no mostró la incorporación del cofactor (Figura 14B), por lo que se requieren estudios posteriores para obtener la holoproteína activa.

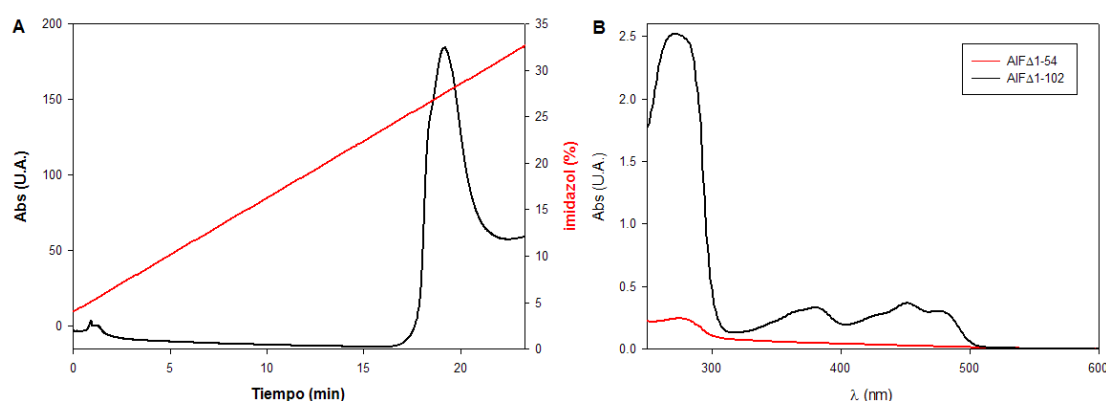


Figura 14. A) Cromatograma de la purificación de hAIF $_{\Delta 1-54}$. B) Espectros UV-visible de hAIF $_{\Delta 1-54}$ (10 nM) y hAIF $_{\Delta 1-102}$ (15 μ M).

4.2. Caracterización espectroscópica de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y mutantes

4.2.1. Espectros UV-visible de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y mutantes, y determinación de sus coeficientes de extinción

El espectro de absorción UV-visible de hAIF $_{\Delta 1-102}$ muestra dos máximos en la región del visible a 452 y 380 nm, correspondientes a las transiciones de las bandas I y II de su cofactor flavínico, respectivamente. Estos máximos se ven desplazados ligeramente en los distintos mutantes (Figura 15).

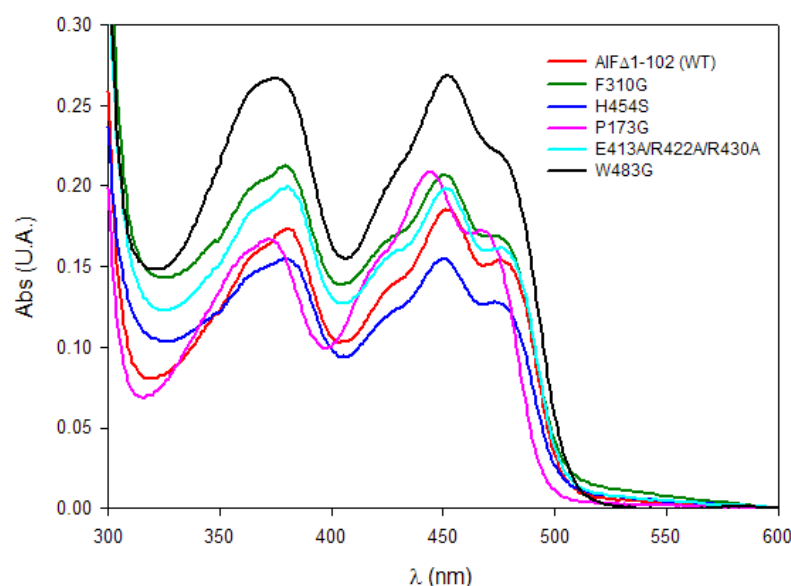


Figura 15. Espectros de hAIF $_{\Delta 1-102}$ (WT) y de sus mutantes en Fosfato 50 mM, pH = 8. Todas las variantes están en concentración 15 μ M excepto H454S, cuya concentración es 11 μ M, y W483G, de concentración desconocida al no haberse podido determinar su coeficiente de extinción.

P173G mostró cambios significativos en su espectro, ya que el máximo de la banda I se desplaza a 444 nm, mientras que el de la banda II se desplaza a 372 nm. Esto evidencia que la sustitución de Pro173 altera el entorno del anillo de isoaloxacina del FAD. Los máximos obtenidos para el resto de las mutaciones no varían o varían levemente respecto a los de la proteína nativa (Tabla 1).

Por otra parte, se determinó el coeficiente de extinción tanto de hAIF $_{\Delta 1-102}$ como de sus distintos mutantes (Tabla 1) como se ha explicado anteriormente en el apartado 3.4.1.

Tabla 1: Coeficientes de extinción de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y mutantes		
	ϵ (mM $^{-1}$ cm $^{-1}$)	λ (nm)
hAIF $_{\Delta 1-102}$	13.56 \pm 0.70	452
F310G	14.65 \pm 0.62	451
H454S	15.26 \pm 0.11	451
P173G	14.38 \pm 1.06	444
W483G	N.D.	450
E413A/R422A/R430A	14.73 \pm 0.90	451

*N.D. no determinado

Se observan ligeras diferencias entre las distintas variantes y la forma nativa tanto en el valor del coeficiente de extinción obtenido en la banda I como en la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia. Estas diferencias seguramente se deben a

cambios en el entorno del FAD, lo que provoca no sólo el desplazamiento del máximo de absorción sino también cambios en la cantidad de luz absorbida.

4.2.2 Espectroscopía diferencial

Estudios previos (Churbanova *et al.*, 2008) habían determinado una alta afinidad entre la forma reducida de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y NAD $^{+}$ tras la reducción con NADH de la forma oxidada de hAIF $_{\Delta 1-102}$. En este trabajo se planteó determinar la afinidad de unión entre la forma oxidada de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y NAD $^{+}$, con el fin de establecer si la alta afinidad entre la forma reducida de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y NAD $^{+}$ se debía al estado de óxido-reducción de la proteína.

Las titulaciones de hAIF $_{\Delta 1-102}$ con NAD $^{+}$ seguidas espectroscópicamente no permitieron determinar la unión entre la proteína y el ligando en el rango de concentraciones ensayado. El valor máximo de concentración de NAD $^{+}$ ensayado fue 4.5 mM frente a una concentración 6.6 nM de AIF. Este resultado negativo implica una afinidad nula, o al menos muy baja, de la forma oxidada de hAIF $_{\Delta 1-102}$ por el NAD $^{+}$.

4.3. Caracterización de la actividad óxido-reductasa de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y de sus mutantes

4.3.1 Caracterización cinética en estado estacionario

En estudios previos (Ferreira *et al.*, 2012), se han estudiado otros compuestos con el fin de descubrir la naturaleza del aceptor de electrones de AIF, el cual todavía es desconocido actualmente. Dado que la función óxido-reductasa de AIF ha sido relacionada con la biogénesis y/o ensamblaje de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, y teniendo en cuenta que la coenzima Q10 realiza el transporte de electrones entre estos dos complejos, se decidió analizar la capacidad de hAIF $_{\Delta 1-102}$, una vez reducida por NADH, de reducir distintos sustratos de tipo quinona.

Al ensayar la capacidad de hAIF $_{\Delta 1-102}$ para reducir los aceptores de electrones 1,4-benzoquinona, 1,2-naptoquinona, coenzima Q1 y coenzima Q10, se utilizó NADH en concentración no saturante, ya que estos compuestos presentan baja solubilidad en soluciones acuosas. Por ello sólo se pudo calcular una actividad aparente de hAIF $_{\Delta 1-102}$ para estos sustratos (Tabla 2).

Tabla 2. Cinéticas en estado estacionario de hAIF $_{\Delta 1-102}$ con distintos aceptores de electrones

Aceptores	Actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Act. específica (min^{-1})
1,4-Benzoquinona	2.087	27.83
1,2-Naptoquinona	3.595	47.94
Coenzima Q1	1.032	13.06
Coenzima Q10	0.495	6.26

Los valores de actividad obtenidos para estas quinonas son menores que los obtenidos en trabajos previos con otros aceptores como DCPIP y ferricianuro (Ferreira *et al.*, 2012). Además, los resultados de la tabla muestran que AIF presenta menor actividad

con las coenzimas ensayadas en comparación con la obtenida con las otras dos quinonas, siendo todas estas actividades del mismo orden.

En los ensayos que se realizaron utilizando concentraciones superiores de NADH se observó inhibición de la cinética. De hecho, al realizar estos ensayos con la coenzima Q1, la actividad de hAIF $_{\Delta 1-102}$ se inhibió por completo al usar una concentración de NADH 400 μ M.

4.3.2. Caracterización cinética en estado pre-estacionario

Inicialmente, y con anterioridad a este trabajo, se habían reducido la enzima nativa hAIF $_{\Delta 1-102}$ y algunos de sus mutantes con NADH en condiciones aerobias (Villanueva, 2010). Mientras que la forma nativa no sufría reoxidación, varios de los mutantes sí intercambiaron electrones con el oxígeno presente en la muestra. Al llevar a cabo la reducción de hAIF $_{\Delta 1-102}$ (WT) en condiciones anaeróbicas no se produjo ninguna alteración en su velocidad de reducción, es decir, las medidas de la proteína nativa se podían realizar tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

Sin embargo, debido a la reoxidación observada previamente en varias de las formas mutantes, su reducción con NADH se ha llevado a cabo en condiciones anaeróbicas. El seguimiento de la reacción se ha realizado a través de la reducción del cofactor de AIF.

4.3.2.1. Reducción de hAIF $_{\Delta 1-102}$ con NADH en cantidades equimolares

Anteriormente se había demostrado la reducción de hAIF $_{\Delta 1-102}$ con NADH al utilizar un exceso de éste último (Ferreira *et al.*, 2012), y cómo dicha reducción conlleva la aparición de CTC. Sin embargo, estos ensayos no demostraban que dicha reducción pudiera tener lugar en condiciones fisiológicas. El ensayo de reducción de hAIF $_{\Delta 1-102}$ con NADH en cantidades equimolares mostró una reducción completa a tiempos largos, acompañada de la formación de CTC (Figura 16A).

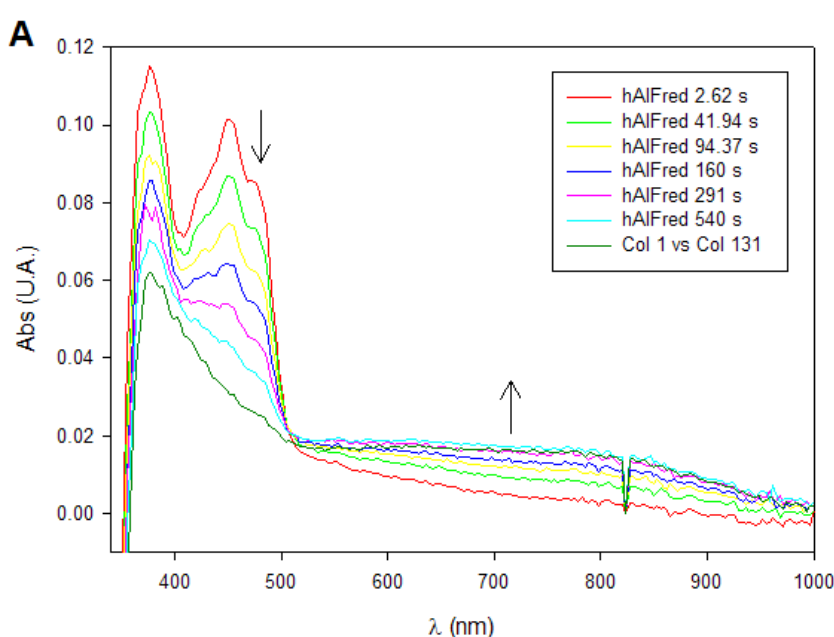
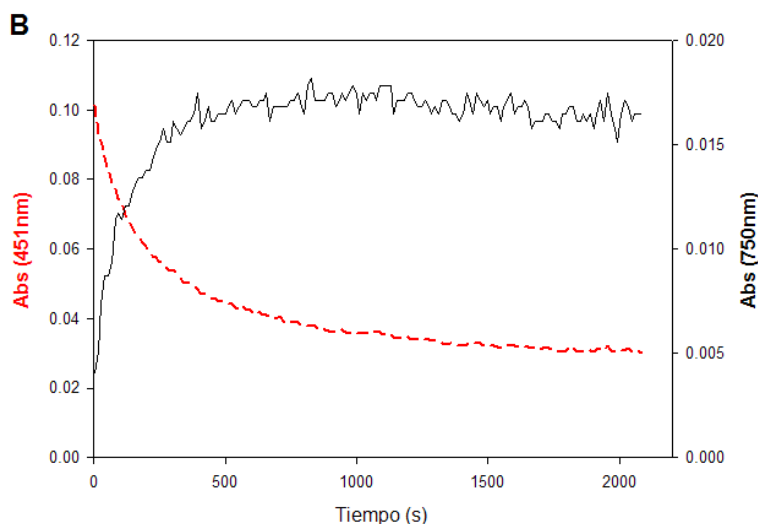


Figura 16.

A) Evolución espectral de la reducción de hAIF $_{\Delta 1-102}$ por NADH en anaerobiosis. Las flechas indican la disminución de la absorbancia en la banda I debido a la reducción y el aumento de la absorbancia debido a la formación del CTC.



B) Representación de la variación de absorbancia a 451 nm (línea roja) y 750 nm (línea negra). En rojo se muestra la disminución de absorbancia debida a la reducción de hAIF, y en negro se refleja la formación del CTC.

Como se observa en la figura 16B, la formación del CTC coincide temporalmente con la reducción de la proteína, de forma que su formación termina al mismo tiempo que el proceso de reducción. Por otra parte, este experimento confirma la posible reducción de AIF con NADH en condiciones fisiológicas. Además, se demuestra que la formación del CTC es independiente de la concentración de NADH utilizada.

4.3.2.2. Reacción de transferencia de hidruro desde el NADH a los mutantes de hAIF_{Δ1-102}

La reducción con NADH en anaerobiosis de las distintas variantes de hAIF_{Δ1-102} mostró una evolución espectral caracterizada por la disminución de la absorbancia a 451 nm, lo que se debe a la reducción del cofactor. Esta evolución estuvo acompañada en la gran mayoría de los mutantes caracterizados por la aparición de complejos de transferencia de carga (CTC) a longitudes de onda superiores a los 600 nm (Figura 17), con la excepción del mutante H454S. Los CTC generados durante el proceso de reducción se corresponden con la formación del complejo hAIF_{red}-NAD⁺, dadas sus características espectrales.

Además, y de forma análoga a lo observado con la forma nativa, la formación de los complejos de transferencia de carga coincide temporalmente con la reducción de la proteína (Figura 18). La formación del complejo de carga se siguió a lo largo del proceso de reducción a través de la variación de la absorbancia a 750 nm, ya que es a esta longitud de onda donde se produce la mayor amplitud del CTC en el caso de todos los mutantes.

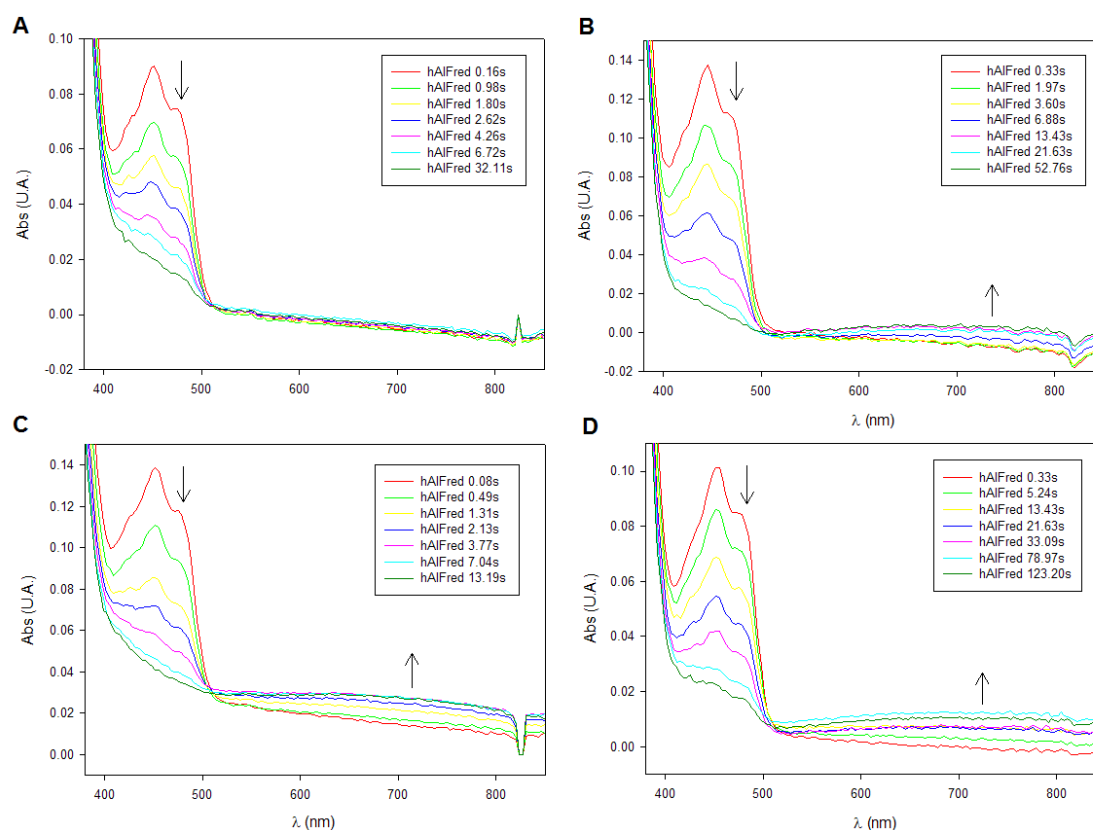


Figura 17. Evolución espectral de la reducción con NADH 312 μ M de los mutantes H454S (A), P173G (B), F310G (C) y E413A/R422A/R430A (D) de hAIF $_{\Delta 1-102}$.

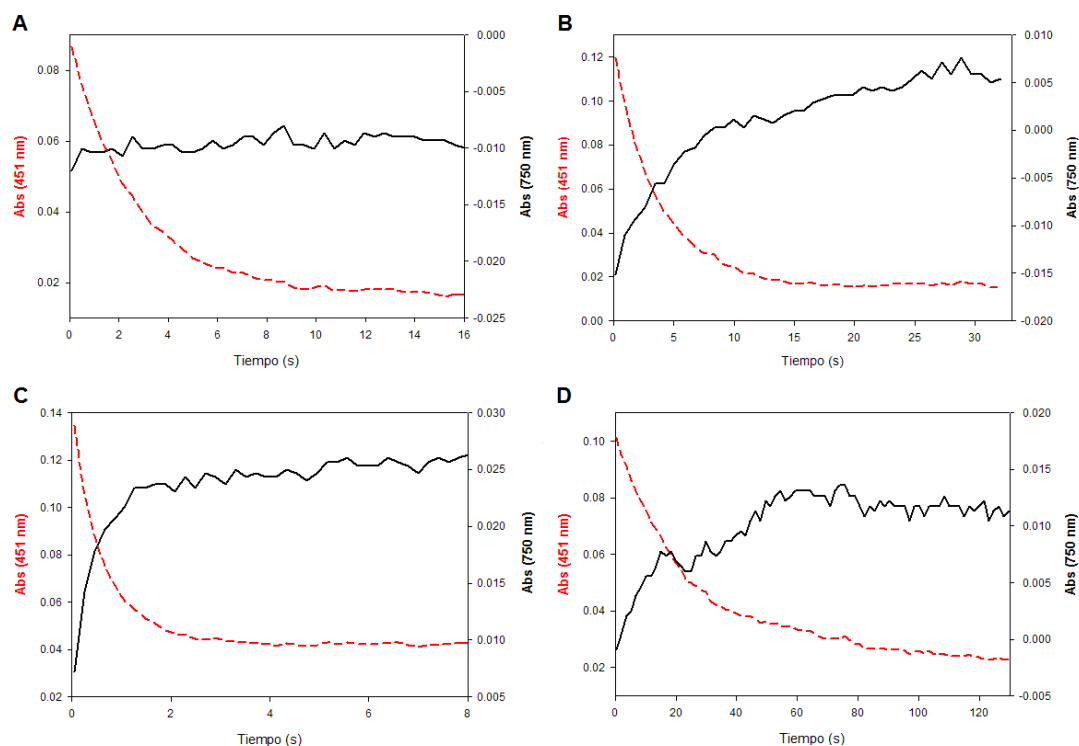


Figura 18. Reducción con NADH 312 μ M de los mutantes H454S (A), P173G (B), F310G (C) y E413A/R422A/R430A (D) de hAIF $_{\Delta 1-102}$. Se representa la variación de absorbancia a 451 nm (línea roja) y 750 nm (línea negra). En rojo se muestra la disminución de absorbancia debida a la reducción de hAIF, y en negro se refleja la formación del CTC

Estas reducciones se llevaron a cabo utilizando distintas concentraciones de NADH (rango 78 μM - 20 mM), lo que permitió determinar la constante observada para dicho proceso de reducción. Al representar los valores de la velocidad de reducción de la flavina (k_{obs}) en función de la concentración de sustrato (Figura 19), se observó una dependencia hiperbólica. El ajuste de dicha dependencia permitió calcular la constante de transferencia de hidruro y la de disociación, las cuales se muestran en la Tabla 3.

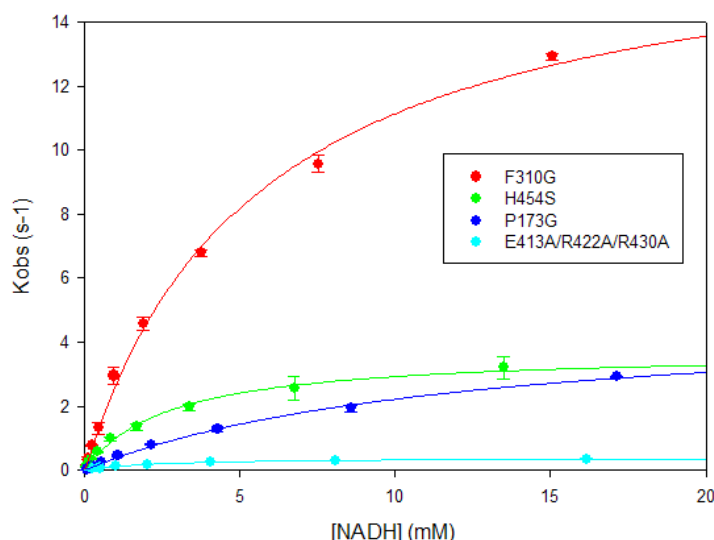


Figura 19. Representación de la dependencia de la k_{obs} respecto a la concentración de NADH en la reducción de los distintos mutantes de hAIF $_{\Delta 1-102}$.

Tabla 3. Constantes cinéticas para la reacción en estado pre-estacionario de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y NADH				
	k_{HT} (s^{-1})	K_d (μM)	k_{HT} / K_d	CTC (750 nm)
hAIF$_{\Delta 1-102}$ (WT) *	1.00 ± 0.10	1213 ± 302	$9.76 \cdot 10^{-4}$	$2.27 \cdot 10^{-2} \pm 1.03 \cdot 10^{-3}$
F310G	17.35 ± 0.68	5585 ± 499	$3.11 \cdot 10^{-3}$	$1.70 \cdot 10^{-2} \pm 3.60 \cdot 10^{-4}$
H454S	3.73 ± 0.15	2743 ± 295	$1.36 \cdot 10^{-3}$	No presenta
P173G	4.90 ± 0.28	12060 ± 1289	$4.06 \cdot 10^{-4}$	$1.89 \cdot 10^{-2} \pm 3.24 \cdot 10^{-4}$
E413A/R422A/R430A	0.39 ± 0.01	2314 ± 157	$1.69 \cdot 10^{-4}$	$2.06 \cdot 10^{-2} \pm 1.42 \cdot 10^{-3}$

*Las cinéticas de todos los mutantes se realizaron a 24°C en tampón fosfato 50 mM, pH 8. Los valores de los CTC representan la diferencia de amplitud a 750 nm entre el valor final, correspondiente a la proteína totalmente reducida, y el valor inicial, correspondiente a la proteína oxidada. Datos extraídos de Ferreira *et al.*, 2012.

Las constantes cinéticas obtenidas para los mutantes presentan grandes diferencias con respecto a las descritas para la enzima nativa hAIF $_{\Delta 1-102}$ con anterioridad (Ferreira *et al.*, 2012). Casi todos los mutantes estudiados presentan una velocidad de transferencia de hidruro mayor que la que se determinó para la forma nativa, siendo especialmente notable en el caso del mutante F310G al ser aproximadamente quince veces mayor. A diferencia del resto de mutantes caracterizados, la velocidad de transferencia de E413A/R422A/R430A fue tres veces menor que la obtenida para la proteína nativa. Además, todos los mutantes caracterizados en este proyecto presentan una constante de disociación mayor que la de la nativa, siendo este valor incluso aproximadamente diez veces superior en el caso del mutante P173G.

Por otra parte, la eficiencia catalítica, calculada como el cociente entre la constante de transferencia de hidruro y la de disociación, mostró valores dispares para los mutantes con respecto a la forma nativa hAIF_{Δ1-102}. P173G y E413A/R422A/R430A presentaron una eficiencia catalítica dos y cinco veces menor respectivamente, mientras que la eficiencia catalítica de H454S y F310G fue un cuarenta por ciento y tres veces superior respectivamente.

5. Discusión

AIF es una proteína conocida principalmente por su función apoptótica, la cual ha sido investigada profundamente. Sin embargo, en los últimos tiempos se ha puesto de manifiesto que esta proteína puede presentar también función óxido-reductasa a través de su cofactor FAD. Además, ambas funciones podrían estar relacionadas, por lo que es de vital importancia profundizar en el conocimiento sobre esta posible función. En este proyecto se busca comprender en mayor medida el mecanismo de acción de la actividad óxido-reductasa de hAIF.

El estudio de la capacidad de hAIF $_{\Delta 1-102}$, una vez reducida por NADH, de reducir distintos sustratos de tipo quinona, mostró una actividad extremadamente baja con todos ellos. Esto sugiere que la reducción de quinonas no es relevante *in vivo*, especialmente al comparar estos resultados con los obtenidos en trabajos previos con otros aceptores de electrones como el DCPIP y el ferricianuro (Villanueva, 2010). Además, se observa que hAIF $_{\Delta 1-102}$ muestra menor actividad con el coenzima Q1 y el coenzima Q10 que con 1,4-benzoquinona y 1,2-naptoquinona, las cuales no tienen relevancia fisiológica. Estos resultados sugieren que AIF no actúa como donador de electrones con sustratos de tipo quinona presentes en las mitocondrias o en la cadena de transporte de electrones.

El estudio de la afinidad de hAIF $_{\Delta 1-102}$ oxidada por NAD $^{+}$ no ha permitido obtener ningún resultado en el rango de concentraciones ensayados, por lo que la afinidad de la proteína oxidada por este compuesto es inexistente o al menos requiere un exceso de NAD $^{+}$ mayor la utilizado (1000x) para que se produzca dicha unión. Este resultado contrasta con el obtenido en estudios previos (Churbanova *et al.*, 2008) para la forma reducida de hAIF $_{\Delta 1-102}$ y NAD $^{+}$, por lo que la unión entre la proteína y el coenzima se dirige por el estado de óxido-reducción de ambas especies.

Por otra parte, se ha demostrado que hAIF $_{\Delta 1-102}$ es capaz de reducirse por completo en concentraciones equimolares de NADH. Esta reducción se produce con la formación de complejos de transferencia de carga similares a los que ya se habían descrito para hAIF $_{\Delta 1-102}$ tratada con exceso de NADH (Ferreira *et al.*, 2011), lo que demuestra la independencia en la formación de estos complejos con respecto a la concentración de coenzima utilizada. Se piensa que estos complejos de transferencia de carga podrían preservar el estado reducido de AIF a la espera de su aceptor fisiológico.

Se ha estudiado el papel de los residuos W483, F310, P173 y H454, pertenecientes al centro activo, y E413, R422A y R430, vinculados a la dimerización. La obtención de espectros UV-visible similares a los de la proteína nativa hAIF $_{\Delta 1-102}$ para los mutantes de estos residuos no nos indica que estas mutaciones hayan producido cambios significativos en el entorno de la flavina, a excepción de la modificación del residuo P173, cuyos máximos están claramente desplazados.

Los datos de mayor relevancia se obtienen en el análisis del mecanismo de transferencia de hidruro de NADH a hAIF $_{\Delta 1-102}$ por medio de cinéticas en estado pre-estacionario. Tras la reducción con NADH, los mutantes estudiados se reoxidaban con el oxígeno presente en el aire, mientras que la forma nativa no reacciona preferentemente con él (Ferreira *et al.*, 2011). Esta gran diferencia demuestra que las mutaciones realizadas afectan considerablemente al centro catalítico de hAIF. Se piensa que la interacción estérica entre el NAD $^{+}$ y el cofactor FAD permite la estabilización del complejo AIF $_{red}$ -NAD $^{+}$, y que dicha estabilización ralentiza el intercambio de NAD $^{+}$ por NADH durante la reducción de la proteína por el coenzima. Además, cabe destacar que también se

observan diferencias notables, de varios órdenes de magnitud, entre las constantes de transferencia de hidruro y de disociación obtenidas para la proteína nativa y los mutantes estudiados.

El residuo P173, que fue sustituido por glicina, mostró una constante de reducción 4 veces mayor que la forma nativa, lo que implica una mayor velocidad de transferencia de hidruro. Además, el valor de K_d hallado para este mutante es el que presenta mayor diferencia con el de la forma nativa, al ser aproximadamente 10 veces superior al de ésta. Estos valores obtenidos para k_{HT} y K_d implican una eficiencia catalítica dos veces menor para este mutante con respecto a la proteína nativa. Por último, este mutante presenta una estabilidad ligeramente menor del complejo de transferencia de carga con respecto a la forma nativa. Todos estos resultados se explican por la sustitución de una prolina, que es un aminoácido cíclico, por una glicina, que presenta menor rigidez y además un tamaño claramente inferior, lo que seguramente implica una mayor presencia de moléculas de solvente en torno al cofactor. Esta sustitución posiblemente disminuye la interacción estérica entre la prolina y el FAD, otorgándole a éste una mayor libertad de movimiento. Esta mayor libertad de movimiento podría justificar que la unión del coenzima para este mutante sea más débil que para la enzima nativa hAIF $_{\Delta 1-102}$, y una menor estabilidad de los complejos de transferencia de carga.

El residuo H454, modificado a serina, muestra también diferencias notables en sus valores de K_d y k_{HT} con respecto a la proteína nativa, al ser estos 2 y 3 veces mayor, respectivamente. La eficiencia catalítica para esta variante supera en un 40% a la de la proteína nativa. Anteriormente se había mostrado en mAIF la importancia de este residuo en las propiedades redox de la proteína, ya que se produce la formación de un puente de hidrógeno entre la histidina y el NAD^+ tras la reducción de la proteína con NADH (Sevrioukova, 2009). El intercambio de una serina por una histidina en esta posición seguramente impide la formación de dicho puente de hidrógeno, lo que proporcionaría una mayor flexibilidad al cofactor. Esto es coherente con el aumento del valor de K_d . Sin embargo, lo más llamativo de esta variante es la supresión de la formación del complejo de transferencia de carga, lo que da idea de la importancia de este residuo en la unión de NAD^+ a la proteína. Esto podría justificar por qué el valor de k_{HT} para este mutante es menor con respecto a otros mutantes, como P173G o F310G, ya que la mutación de este residuo reduce drásticamente la estabilidad del complejo de transferencia de carga, por lo que también podría limitar la unión inicial de NADH.

Por otra parte, el residuo F310, sustituido también por glicina en este trabajo, es de vital importancia en el mecanismo de reducción por NADH, ya que su sustitución provoca los mayores cambios detectados en la constante de transferencia de hidruro. Además, el valor de la constante de disociación también se altera notablemente, así como la estabilidad del complejo de transferencia de carga AIF $_{red}$ - NAD^+ , cuya presencia disminuye nuevamente con respecto a la forma nativa. Pese a que la sustitución de fenilalanina por glicina no altera la carga del residuo, sí afecta drásticamente al tamaño del residuo, por lo que esta mutación implica la desaparición del efecto estabilizador anteriormente descrito (Sevrioukova, 2009). Además, estos resultados sugieren una implicación importante de este residuo no sólo en la estabilización sino también en alguna de las etapas del proceso de transferencia de hidruro.

Por último, la triple sustitución de los residuos E413, R422 y R430 por alaninas también afecta sorprendentemente al mecanismo de transferencia de hidruro, pese a que estos

residuos están implicados en el mecanismo de dimerización y no forman parte del centro activo de la proteína. El cambio observado en la constante de transferencia de hidruro difiere del observado para el resto de mutantes, ya que en este caso dicha constante muestra un valor tres veces menor como consecuencia de las mutaciones realizadas. Sin embargo, la afinidad de este mutante por el coenzima disminuye también en este caso, siendo dos veces menor que la de la enzima nativa hAIF_{Δ1-102}. Así, la eficiencia catalítica para esta variante es cinco veces menor que la de la proteína nativa. Estos datos sugieren que la alteración en la dimerización de hAIF podría afectar también a su actividad óxido-reductasa.

En definitiva, todos los residuos estudiados pertenecientes al centro activo de la proteína son esenciales para el funcionamiento de la actividad óxido-reductasa, ya que todas las alteraciones producidas sobre dichos residuos afectan notablemente al proceso de transferencia de hidruro, condicionando la unión entre la proteína y el coenzima. Estas mutaciones también afectan a la estabilidad de las especies intermedias formadas en dicho proceso de transferencia. Así, los cambios producidos en las interacciones entre estos residuos y el FAD durante el proceso de reducción de la proteína regulan la función óxido-reductasa de AIF.

Sin embargo, se requieren nuevos estudios para llegar a entender por completo el mecanismo de transferencia de hidruro. En futuros estudios también se estudiará el papel de estos residuos en la actividad apoptótica de hAIF, con el fin de determinar si ambas funciones están relacionadas. Así mismo, también se intentará profundizar en el conocimiento del mecanismo de dimerización y las consecuencias de éste sobre las funciones apoptótica y óxido-reductasa.

6. Conclusiones

- Se ha logrado expresar y optimizar las condiciones de cultivo de la forma truncada hAIF $_{\Delta 1-340}$ y de la forma mitocondrial hAIF $_{\Delta 1-54}$.
- Los sustratos de tipo quinona no son los aceptores de electrones naturales de hAIF, ya que su reducción por hAIF_{red} transcurre de forma demasiado lenta. El aceptor natural de electrones de hAIF todavía es desconocido.
- hAIF $_{\Delta 1-102}$ es capaz de reducirse por completo con concentraciones equimolares de NADH, y dicha reducción se acompaña por la formación de complejos de transferencia de carga. AIF podría reducirse con NADH en condiciones fisiológicas y además la formación del CTC es independiente de la concentración de NADH utilizada.
- La forma oxidada de hAIF $_{\Delta 1-102}$ muestra una afinidad nula o muy baja por NAD⁺.
- Los residuos del centro activo W483, F310, P173 y H454 son esenciales para el funcionamiento de la actividad óxido-reductasa, ya que su sustitución altera el proceso de transferencia de hidruro y la unión entre la proteína y el coenzima.
- El residuo P173 es clave en la unión de NADH y en la estabilización del complejo de transferencia de carga, ya que su sustitución por glicina causa una menor afinidad por el coenzima y una menor formación de dichos complejos.
- El residuo H454 también es esencial en la unión de NADH y en la estabilización del complejo de transferencia de carga gracias a la formación de un puente de hidrógeno entre este residuo y el cofactor tras la reducción de hAIF con NADH. Dicha interacción se suprime al sustituir este residuo por serina, lo que debilita la unión del coenzima y suprime la formación del complejo de transferencia de carga.
- El residuo F310 está implicado en la estabilización del complejo de transferencia de carga y en alguna de las etapas del mecanismo de transferencia de hidruro, ya que su sustitución por glicina cambia drásticamente el valor de la constante de transferencia de hidruro, a la vez que reduce la presencia del complejo de transferencia de carga.
- La dimerización de hAIF podría intervenir también en la actividad óxido-reductasa de la proteína, ya que la sustitución por alaninas de los residuos E413, R422A y R430, que participan en la dimerización, también altera la transferencia de hidruro.

7. Bibliografía

Artus, C., et al., *AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX.* EMBO J, 2010. **29** (9): 1585-1599.

Cande, C., et al., *AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis.* Oncogene, 2004. **23** (8): 1524-1521.

Churbanova, I.Y., et al., *Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* J Biol Chemistry, 2008. **283** (9): 5622-5631.

Daugas, E., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis.* FEBS Letters, 2000. **476**: 118-123.

Delettre, C., et al., *AIFsh, a Novel Apoptosis-inducing Factor (AIF) Pro-apoptotic Isoform with Potential Pathological Relevance in Human Cancer.* J Biol Chemistry, 2006. **281** (10): 6413-6427.

Delettre, C., et al., *Identification and Characterization of AIFsh2, a Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor (AIF) Isoform with NADH Oxidase Activity.* J Biol Chemistry, 2006. **281** (27): 18507-18518.

Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death.* Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): 495-516.

Ferreira, P., et al., *Unraveling the role of the reductase activity of the human apoptosis inducing factor.* Proceedings of Flavins and Flavoproteins (Congress), 2011. En prensa.

Ferreira, P., et al., *The oxido-reductase activity of the Apoptosis inducing factor: a promising pharmacological tool?* Current Pharmacological Design, 2012. En prensa.

Ferreira, P., et al., *The oxido-reductase activity of the human Apoptosis inducing factor: dimerization and catalytic efficiency.* En escritura, 2012.

Häcker, G., *The morphology of apoptosis.* Cell Tissue Res, 2000. **301**: 5-17.

Jorns M.S., et al., *Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis.* J Biol Chemistry, 1987. **262** (1): 486-491.

Kerr, J.F., et al., *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics.* Br J Cancer, 1972. **26** (4): 239-257.

Kitagawa, K., et al., *Caspase-independent mitotic death (CIMD).* Cell Cycle, 2008. **7** (8): 1001-1005.

Klein, J.A., et al., *The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor.* Nature, 2002. **419** (6905): 367-374.

Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227** (5259): 680-685

- Lipton, S.A., et al.,** *Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity.* Cell, 2002. **111** (2): 147-150.
- Liu, X., et al.,** *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c.* Cell, 1996. **86** (1): 147-157.
- Loeffler, M., et al.,** *Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor.* FASEB J, 2001. **15**: 758-767.
- Mate, M.J., et al.,** *The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF.* Nat Struct Biol, 2002. **9** (6): 442-446.
- Miramar, M.D., et al.,** *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* J Biol Chem, 2001. **276** (19): 16391-16398.
- Modjtahedi, N., et al.,** *Apoptosis inducing-factor: vital and lethal.* Trends Cell Biol., 2006. **16** (5): 264-272.
- Murty, C.V., et al.,** *Pregnancy suppression by active immunization against gestation-specific riboflavin carrier protein.* Science, 1982. **216** (4542): 191-193.
- Otera, H., et al.,** *Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space.* EMBO J, 2005. **24** (7): 1375-1386.
- Polster, B.M., et al.,** *Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria.* J Biol Chem, 2005. **280** (8): 6447-6454.
- Sevrioukova, I.F.,** *Redox-linked conformational dynamics in apoptosis-inducing factor.* J Mol Biol, 2009. **390** (5): 924-938.
- Sevrioukova, I.F.,** *Apoptosis-inducing factor: structure, function and redox regulation.* Antioxid Redox Signal, 2011. **14**: 2545-2579.
- Smith, D.J., et al.,** *The Mitochondrial Gateway to Cell Death.* IUBMB Life, 2008. **60** (6): 383-389.
- Susin, S.A. et al.,** *Bcl-2 Inhibits the Mitochondrial Release of an Apoptogenic Protease.* J. Exp. Med., 1996. **184**: 1331-1341.
- Susin, S.A., et al.,** *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* Nature, 1999. **397** (6718): 441-446.
- Vahsen, N., et al.,** *AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation.* EMBO J, 2004. **23** (23): 4679-4689.
- van Loo, G., et al.,** *The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.* Cell Death Differ, 2002. **9** (10): 1031-1042.

Villanueva, R., *Caracterización redox del Factor de Inducción de Apoptosis humano (hAIF)*. Proyecto Máster en Biología Molecular y Celular, 2010. Universidad de Zaragoza.

White H.B. III, et al., *Riboflavin-binding proteins*. Annual Review of Nutrition, 1988. **8**: 279-299.

Ye, H., et al., *DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor*. Nat Struct Biol, 2002. **9** (9): 680-684.

Ying, W., *NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10** (2): 179-206.

Zanetti, G., et al., *Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase*. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, 1991. F. Müller, Ed. Boca Raton, CRC Press. **2**: 305-351.

Zhu, C., et al., *Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia*. J Exp Med, 2007. **204** (8): 1741-1748.